

Povoľujem zapožičanie svojej diplomovej práce na študijné účely a prosím, aby bola vedená presná evidencia vypožičiavateľov. Prevzaté údaje je vypožičiavateľ povinný riadne ocitovať.

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

Študijný program: Biológia
Študijný odbor: Genetika, molekulárna biológia a virológia



Bc. Jana Rušinová

Úloha Hac1p pri morfogénéze kvasinkových kolónií

The effect of Hac1p on the development of yeast colony

Diplomová práca

Vedúci záverečnej práce: RNDr. Michaela Schierová, Ph.D.

Praha, 2013

Prehlásenie:

Prehlasujem, že som záverečnú prácu spracovala samostatne a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Tato práca a ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe, 15.08.2013

Podpis

Táto práca vznikala v rokoch 2011 až 2013 za finančnej podpory grantových projektov SVV-2013-267205 „Molekulárne bunčný výzkum virů a bunčných organismů“ a GAČR 13-08605S „Biofilmové kolonie divokých kvasinek: Vývoj, obranné strategie a regulační dráhy“.

Táto práca vznikla pod vedením RNDr. Michaely Schierovej, Ph.D., ktorej by som chcela touto cestou poďakovať za odborné vedenie, trpezlivosť a podporu, ktorú mi dodávala po celú dobu mojej práce.

Prof. RNDr. Zdene Palkovej CSc. a RNDr. Libuši Váchovej by som sa rada úprimne poďakovala za cenné rady, inšpiratívne postrehy a priateľnosť.

Ďakujem všetkým členom Laboratórií biológie kvasinkových kolónií, menovite RNDr. Vratislavovi Šťovíčkovi, Ph.D. a Mgr. Vítězslavovi Plockovi, nielen za ochotu, pomoc a rady pri rade experimentov, ale i za vytvorenie príjemného pracovného prostredia.

V neposlednej rade by som rada poďakovala mojej rodine za materiálnu a morálnu podporu, ktorú mi poskytovali počas celej doby môjho štúdia, kamarátom za ústretovosť a svojmu budúcemu manželovi Mirkovi za trpezlivosť a pomoc.

Abstrakt

Prírodné kmene kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* vytvárajú na pevnom médiu štruktúrované kolónie podobné biofilmom, čo im umožňuje dlhodobé prežívanie v nepriaznivých podmienkach prostredia. Molekulárny mechanizmus časopriestorového vývoja kolónií a rezistencie voči nehostinným podmienkam je však stále z veľkej časti neznámy. Hlavným cieľom tejto práce bola analýza vplyvu génu *HAC1* na morfológiu kolónií. Proteín Hac1p aktivuje bunkovú odpoveď na prítomnosť nezbalených proteínov (UPR), v rámci ktorej sa aktivuje expresia génov kódujúcich proteíny zahrnuté v sekrečnej dráhe a potláčaní stresu v endoplazmatickom retikule (ER). Vplyv delécie génu *HAC1* sa preukázal i za nestresových podmienok a viedol ku radikálnemu zníženiu vrásčitosti kolónií delečných kmeňov odvodených od dvoch prírodných kmeňov *S. cerevisiae* (PORT a BR-F-Flo11p-GFP) a laboratórneho kmeňa Σ^h , ktoré tvoria polovrásčité alebo vrásčité kolónie. Mutantné kmene *hac1Δ* mali zároveň spomalený vegetatívny rast, znížený charakter vrastania do agaru a zníženú tvorbu zhlukov buniek. U kmeňov *hac1Δ* odvodených od kmeňa BR-F-Flo11p-GFP bola zistená veľmi nízka hladina povrchového adhezínu Flo11p nevyhnutného pre vytvorenie štruktúrovanej architektúry kvasinkovej kolónie. Je pravdepodobné, že produkcia niektorého proteínu, zúčastňujúceho sa posttranslačných modifikácií Flo11p, je pod kontrolou Hac1p. To predpokladá udržiavanie bazálnej hladiny UPR, príp. jej krátkodobú aktiváciu i za nestresových podmienok počas vegetatívneho rastu kolónií. Kmene s deléciou génu *HAC1* ďalej vykazovali zvýšenú citlivosť voči induktorom stresu v ER aj voči agens narúšajúcim biosyntézu a integritu bunkovej steny a voči teplote 37 °C. Sledovaním hladiny Sec61p, ktorý je pod kontrolou Hac1p, sme nezistili, že by v niektorej fáze vývoja kolónie došlo ku aktivácii UPR.

Kľúčové slová: kvasinky, štruktúrované kolónie, Hac1p, stres v ER, Flo11p, Sec61p

Abstract

On solid surfaces wild strains of *Saccharomyces cerevisiae* form biofilm-like, structured colonies enabling them to survive long-term in hostile environments in the wild. However, the molecular mechanisms underlying the spatio-temporal development of colonies and their resistance to hostile conditions are still largely unknown. In this study, we analyzed the effect of the *HAC1* gene on the colony morphology of wild strains of *S. cerevisiae*. The transcription factor Hac1p activates the unfolded protein response (UPR), which leads to activation of the expression of genes encoding components of the protein secretory pathway, and genes involved in stress responses in the endoplasmic reticulum (ER). The impact of *HAC1* deletion is significant even under non-stress conditions and causes a radical reduction of structured colony architecture in *hac1Δ* strains derived from two wild *S. cerevisiae* strains (PORT and BR-F-Flo11p-GFP) and one laboratory Σ S^h strain forming semi-fluffy or fluffy colonies. The *hac1Δ* strains exhibit a decreased vegetative growth rate, reduced cell attachment to the agar and an ineffective cell-cell adhesion resulting in decreased flocculation. The *hac1Δ* strains derived from BR-F-Flo11p-GFP contain a low level of Flo11p surface adhesin which is considered very important for the proper formation of structured colony architecture. It is probable that production of any protein involved in Flo11p posttranslational modifications is under the control of Hac1p. A basal level of UPR or its short-term activation under non-stress conditions is predicted during colony vegetative growth. Moreover, *hac1Δ* cells display increased sensitivities to inducers of ER stress, cell wall-perturbing agents and to incubation at 37 °C. Analysis of Sec61p production which is under Hac1p transcriptional control did not indicate any activation of the UPR during colony development.

Key words: yeast, structured colony, Hac1p, unfolded protein response, Flo11p, Sec61p

Obsah

1	Úvod	9
2	Prehľad literatúry	11
2.1	Mikrobiálne mnohobunkové štruktúry	11
2.1.1	Charakteristika proteínu Flo11p u <i>S.cerevisiae</i>	11
2.2	Dôvod výberu génu <i>HAC1</i>	12
2.3	Charakteristika génu <i>HAC1</i> a proteínu Hac1p u <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
2.4	Hac1p a bunková odpoveď na prítomnosť nezbalených proteínov u <i>S. cerevisiae</i>	16
2.5	Modulácia UPR histón acetyltransferázovým komplexom SAGA a Ypt1p	19
2.6	Odpoveď na stres v ER u iných druhov húb	21
2.7	Modelový gén pre štúdium UPR u kvasinky <i>S. cerevisiae</i>	27
2.8	Regulácia transkripcie génov s intrónom	27
3	Ciele práce	32
4	Materiál a metódy	33
4.1	Materiál	33
4.1.1	Použitie mikroorganizmy	33
4.1.2	Zoznam pripravených kvasinkových kmeňov	34
4.1.3	Vektory	34
4.1.4	Primery	37
4.1.5	Chemikálie a enzýmy	38
4.1.6	Komerčné roztoky	41
4.1.7	Médiá pre kultiváciu kvasiniek	41
4.1.8	Antibiotiká	42
4.1.9	Ostatné	42
4.1.10	Štandardy molekulových hmotností	43
4.1.11	Počítačové programy a internetové databázy	43
4.2	Metódy	44
4.2.1	Sterilizácia	44
4.2.2	Práca s baktériami	44
4.2.3	Práca s kvasinkovými kultúrami	47
4.2.4	Analýza a charakterizácia kmeňov	59
4.2.5	Metódy práce s proteínmi	66
5	Výsledky	73
5.1	Izolácia kmeňov	73
5.1.1	Príprava kmeňov s viacnásobnými zmenami genotypu	74
5.2	Význam využitia kmeňov s fúziou Sec61p s GFP	75
5.3	Význam využitia kmeňov s fúziou Flo11p s GFP	75
5.4	Analýza kmeňov s deléciou a zvýšenou expresiou génu <i>HAC1</i> odvodených od kmeňa PORT	76

5.4.1	Morfologické charakteristiky kolónií kmeňov s deléciou a zvýšenou expresiou <i>HAC1</i> odvodených od kmeňa PORT	76
5.4.2	Rastové analýzy kmeňov s deléciou a zvýšenou expresiou <i>HAC1</i> odvodených od kmeňa PORT za neselektívnych podmienok	80
5.4.3	Porovnanie morfológie buniek a intenzity signálu Sec61p-GFP pomocou mikroskopu	86
5.4.4	Porovnanie intenzity signálu Sec61p-GFP pomocou spektrofluorimetra	89
5.4.5	Porovnanie hladiny Sec61p-GFP pomocou imunodetekcie	94
5.4.6	Porovnanie zloženia intracelulárnych proteínov pomocou farbenia striebrom	96
5.5	Analýza kmeňov s deléciou a zvýšenou expresiou génu <i>HAC1</i> odvodených od kmeňa BR-F-Flo11p-GFP	98
5.5.1	Morfologické charakteristiky kolónií kmeňov s deléciou a zvýšenou expresiou <i>HAC1</i> odvodených od kmeňa BR-F-Flo11p-GFP	98
5.5.2	Rastová analýza kmeňov s deléciou a zvýšenou expresiou <i>HAC1</i> odvodených od kmeňa BR-F-Flo11p-GFP za neselektívnych podmienok	101
5.5.3	Porovnanie morfológie buniek a intenzity signálu Flo11p-GFP pomocou mikroskopu	105
5.5.4	Porovnanie intenzity signálu Flo11p-GFP pomocou spektrofluorimetra	107
5.6	Porovnanie citlivosti kmeňov voči rôznym typom inhibítorov	108
5.7	Morfologické charakteristiky kolónií kmeňov s deléciou <i>HAC1</i> odvodených od kmeňov BY4742 a Σ^h	114
5.8	Morfologické charakteristiky kolónií kmeňov so zvýšenou expresiou <i>HAC1</i> odvodených od kmeňa BR-S	119
6	Diskusia	121
6.1	Vplyv selénu	121
6.2	Vplyv génu <i>HAC1</i> a jeho homológov na morfogénzu húb	122
6.3	<i>HAC1</i> a adhezíny	124
6.4	<i>HAC1</i> , virulencia a sekrécia proteínov	126
6.5	Efekt zvýšenej expresie génu <i>HAC1</i> a jeho homológov u húb	128
6.6	Citlivosť rôznych druhov húb s deléciou génu <i>HAC1</i> voči inhibítorom	128
7	Súhrn	132
8	Zoznam použitej literatúry	134

Zoznam skratiek

2-DG	2-deoxy-D-glukóza (2-Deoxy-D-glucose)
<i>AbHACA</i>	gén kódujúci homológ génu <i>HAC1 Saccharomyces cerevisiae</i> u <i>Alternaria brassicicola</i>
AESBF	4-(2-aminoetyl) benzénsulfonylfluorid hydrochlorid (4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride), inhibitor proteáz
BFM	brómfenolová modrá (Bromophenol Blue)
bp	pár bází (base pair)
BR-F	prírodný diploidný kmeň <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
BR-S	diploidný kmeň <i>Saccharomyces cerevisiae</i> odvodený od kmeňa BR-F jeho domestifikáciou za laboratórnych podmienok a kultiváciou na bohatom agarovom médiu
BSA	hovädzí sérový albumín (Bovine Serum Albumin)
BY4742	haploidný laboratórny kmeň <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
bZIP	motív základného leucínového zipsu (The basic Leucine Zipper Domain)
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CFW	Calcofluor White Stain, inhibitor narúšajúci bunkovú stenu
CR	Congo Red, inhibitor narúšajúci bunkovú stenu
CWI-MAPK	dráha mitogénom aktivovanej proteín kinázy, ktorá indukuje gény podieľajúce sa na obnove bunkovej steny (the Cell Wall Integrity Mitogen-Activated Protein Kinase pathway)
dest. H ₂ O	destilovaná voda
DMSO	dimetyl sulfoxid (Dimethyl sulfoxide)
dNTP	deoxynukleosid trifosfát (deoxyribonucleotide triphosphate)
DTT	DL-Dithiotreitol
ECM	extracelulárna matrix (Extracellular Matrix)
e-gény	gény bez intrónov (single-exon genes)
ER	endoplazmatické retikulum (Endoplasmic Reticulum)
ERAD	degradácia proteínov asociovaných s ER (ER-Associated protein Degradation)
EtBr	ethidiumbromid (Ethidium Bromide)
EtOH	etanol (Ethanol, CH ₃ CH ₂ OH)
<i>FLO11</i>	gén kódujúci povrchový proteín Flo11p
G418	geneticín, aminoglykozidové antibiotikum
GFP	zelený fluorescenčný proteín (Green Fluorescent Protein)
GM	médium s 3% glycerolom (Glycerol Medium)
GPI	glykozylfosfatidylinozitol (Glycophosphatidylinositol)
<i>HAC1</i>	gén kódujúci Hac1p, ktorý aktivuje UPR u <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (tiež názov pre jeho funkčný homológ u <i>Candida albicans</i>)
<i>hac1Δ</i>	kmeň s deléciou génu <i>HAC1</i>
<i>HAC1i</i>	zostrihnutá forma mRNA <i>HAC1</i> („i“ ako indukovaný, z angl. „induced“)
<i>HAC1u</i>	nezostrihnutá forma mRNA <i>HAC1</i> („u“ ako neindukovaný, z angl. „uninduced“)
<i>HACA</i>	gén kódujúci homológ génu <i>HAC1 Saccharomyces cerevisiae</i> u <i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>HXL1</i>	gén kódujúci proteín Hxl1p u <i>Cryptococcus neoformans</i> , aktivuje UPR pri stresových podnetoch, nie je sekvenčne homológny s <i>HAC1/XBP1 (HAC1 and XBP1-Like gene 1)</i>
i-gény	gény s intrónmi (intronic genes)
IME	intrónom sprostredkované zosilnenie transkripcie (Intron-Mediated Enhancement)
<i>INO1</i>	gén kódujúci inozitol 3-fosfát syntázu
<i>IRE1</i>	gén kódujúci proteín Ire1p lokalizovaný v membráne ER, iniciuje nekonvenčný zostrih intrónu mRNA <i>HAC1</i> pri strese v ER
jedn.	jednotka
KAc	octan draselný (Potassium Acetate)
<i>kanMX</i>	gén, transformovaným bunkám dáva rezistenciu voči G418
kbp	kilopárov bází (kilobase pair)
kDa	tisíce Daltonov (Kilodalton)
LA DNA Pol Mix	LA DNA polymerázový mix (LA DNA Polymerase Mix)
LB	Luria Bertani médium (Luria Bertani Medium)
MAPK	mitogénom aktivovaná proteín kináza (Mitogen-Activated Protein Kinase)
MES	kyselina 2-(N-morfolino)etanosulfonová (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid)
NAT	nourseothricín, antibiotikum

<i>NAT1</i>	gén kódujúci nourseothricín N-acetyl-transferázu, transformovaným bunkám dáva rezistenciu voči NAT
OD	optická denzita (Optical Density)
ORF	otvorený čítací rámec (Open Reading Frame)
PCR	polymerázová reťazová reakcia (Polymerase Chain Reaction)
PCR dNTP mix	PCR 2'-deoxynukleozid-5'-trifosfátová zmes (PCR Deoxynucleotide Mix)
PEG	polyetylén glykol (Polyethylene Glycol)
PIC	zmes inhibítorov proteáz (Protease Inhibitor Cocktail)
PMSF	fenylmetánsulfonyl fluorid (Phenylmethanesulfonyl Fluoride)
PORT	prírodný diploidný kmeň <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
priem.	priemerný
<i>RLG1</i>	gén kódujúci tRNA ligázu Rlg1p, ktorá liguje 5' a 3' terminálne štiepne produkty mRNA <i>HAC1</i> po zostrihu intrónu
RNáza A	ribonukleáza A (Ribonuclease A)
ROS	voľné kyslíkové radikály (Reactive Oxygen Species)
SAGA	histón acetyltransferázový komplex (Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase complex)
SDS	dodecylsulfát sodný (Sodium Dodecyl Sulfate)
SDS-PAGE	SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
<i>SEC61</i>	gén kódujúci proteín Sec61p, ktorý je súčasťou translokónu v membráne ER
Ser/Thr	serín/threonín (Serine/Threonine)
ssDNA	jednovláknová DNA (single stranded DNA, salmon sperm DNA)
TEF	gén pre translačný elongačný faktor 1α z filamentárnej huby <i>Ashbya gossypii</i> , v tejto práci skratka pre promótor génu <i>TEF</i>
TEMED	N,N,N',N'-tetrametylénetyléndiamín ((N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)
TF	transkripčný faktor (Transcription Factor)
UPR	bunková odpoveď na prítomnosť nezbalených proteínov (Unfolded Protein Response)
UPRE	element UPR v promótorovej oblasti génov, ktoré rozpoznáva Hac1p pri aktivácii UPR (Unfolded Protein Response Element)
UTR	neprekladaná oblasť génu (Untranslated Region)
v/v	objem/objem (volume/volume)
w/v	hmotnosť/objem (weight/volume)
WT	divoký kmeň (wild type)
<i>XBPI</i>	gén kódujúci cicavčí homológ génu <i>HAC1 Saccharomyces cerevisiae</i> (gén má rovnaké označenie i u <i>Caenorhabditis elegans</i>)
YD	médium s 2% glukózou
YEPD	komplexné kvasinkové médium (Yeast Extract Peptone Dextrose)
ΣS ^h	haploidný laboratórny kmeň <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

1 Úvod

Bežne sú kvasinky v laboratóriách skúmané ako individuálne bunky rastúce v trepaných tekutých kultúrach, čo umožnilo odhaliť mechanizmy ich rastu a delenia. Takýto spôsob kultivácie však bráni medzibunkovej komunikácii, vytvoreniu gradientov signálnych molekúl a orientovanému rastu buniek, čo je typické pre „divoké“ kmene kvasiniek rastúce na pevnom podklade v prírode. V prírodných podmienkach je prevládajúcou formou mikroorganizmov, vrátane kvasiniek, organizovaná mnohobunková štruktúra – povlaky, biofilmy a kolónie. Mnohobunkovosť a diferenciácia umožňuje mikroorganizmom dlhodobé prežívanie za podmienok enviromentálneho stresu a limitovaného zdroja živín. Rada procesov, pôvodne prisudzovaných iba „pravým“ mnohobunkovým organizmom (napr. diferenciácia), bola zistená i u mnohobunkových štruktúr tvorených mikroorganizmami. Štúdium molekulárnych a bunkových mechanizmov uplatňujúcich sa pri tvorbe a diferenciácii mnohobunkových mikrobiálnych útvarov môže objasniť i procesy dôležité pre tvorbu a vývoj tkanív živočíchov, vrátane človeka (PÁLKOVÁ a VÁCHOVÁ 2006). Za posledné desaťročie sa i preto kolónie kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* stali modelom pre štúdium mikrobiálnej mnohobunkovosti, vrátane štúdia procesov bunkovej diferenciácie a komunikácie. V roku 2012 Čáp a kol. publikovali článok, v ktorom podrobne popísali metabolické a regulačné paralely medzi diferencovanou hladkou kolóniou laboratórneho kmeňa *S. cerevisiae* a organizmom napadnutým nádorom.

Morfogenéza a štruktúra monokolónií, t.j. kolónií vznikajúcej z jednej bunky, sa v našom laboratóriu študuje na dvoch rôznych prírodných „divokých“ kmeňoch kvasiniek *S. cerevisiae* s odlišným genetickým pozadím, ktoré sú v práci označené ako kmene BR-F a PORT. Kmeň BR-F bol pôvodne izolovaný z vody rybníka Jakubov na juhozápadnom Slovensku a bol získaný zo zbierky Chemického ústavu Akadémie vied Slovenskej republiky v Bratislave. Na pevnom komplexnom médiu s 3% glycerolom ako zdrojom uhlíka vytvára štruktúrované, vrásčité kolónie. Kmeň PORT je jedným z kmeňov zo súboru portugalských „divokých“ kvasiniek izolovaných z viníc, ktoré boli získané vďaka spolupráci s Univerzitou v Brage (Dorit Schuller a Margarida Casal). Kmeň PORT vytvára na pevnom komplexnom médiu s 3% glycerolom hladké až polovrásčité kolónie, v prítomnosti nízkej koncentrácie selénanu sodného (0,05 mmol Na_2SeO_4) vytvára štruktúrované, vrásčité kolónie. Mechanizmus indukcie vrásčitého fenotypu u kmeňa PORT po pridaní Na_2SeO_4 do média nie je známy a je jedným z predmetov štúdia v našom laboratóriu.

Cieľom mojej práce bolo popísať funkciu vytipovaného proteínu Hac1p pri tvorbe a vývoji kolónií „divokých“ kmeňov *S. cerevisiae* BR-F a PORT. Gén *HAC1* kóduje transkripčný faktor, ktorý aktivuje bunkovú odpoveď na prítomnosť nezbalených proteínov (UPR – Unfolded Protein Response) pri strese v drsnom endoplazmatickom retikule. Gén *HAC1* patrí do skupiny ~ 5 % génov *S. cerevisiae*, ktoré obsahujú intrón. Delécia génu *HAC1* vedie ku strate vrásčitosti v prítomnosti selénanu sodného.

Mojím prvým cieľom bolo morfologicky a fyziologicky charakterizovať kmene s deléciou génu *HAC1* u oboch prírodných kmeňov kvasiniek *S. cerevisiae* odlišného pôvodu. Následne bolo mojou úlohou skonštruovať a charakterizovať kmene odvodené od kmeňov BR-F a PORT s konštitutívnou expresiou génu *HAC1* pod kontrolou promótora TEF. Morfologická a fyziologická charakterizácia pripravených kmeňov zahŕňala sledovanie morfológie ich kolónií v závislosti na čase a rôznych kultivačných podmienkach, sledovanie charakteru vrastania kolónií do agaru, či porovnanie tvaru a veľkosti buniek s rodičovskými kmeňmi.

Ďalšou úlohou bolo vykonať rastové analýzy kmeňov za neselektívnych podmienok a testovať ich citlivosť voči rôznym typom inhibítorov.

Posledným cieľom práce bolo sledovať vplyv delécie a zvýšenej expresie génu *HAC1* na hladinu proteínu Flo11p, ktorý pozitívne ovplyvňuje vrásčitosť kolónií (ŠŤOVÍČEK a kol. 2010). Funkciu génu *HAC1* som sledovala i pomocou fúzneho proteínu Sec61p-GFP. Sec61p je súčasťou translokónu v membráne drsného endoplazmatického retikula (DESHAIES a SCHEKMAN 1987).

2 Prehľad literatúry

2.1 Mikrobiálne mnohobunkové štruktúry

Kvasinky a baktérie sú v tradičnom ponímaní zaradované medzi jednobunkové organizmy, avšak za určitých rastových podmienok vytvárajú na pevnom médiu organizované mnohobunkové štruktúry – biofilmy, kolónie, vzdušné hýfy a plodnice, v rámci ktorých sa bunky s odlišnými vlastnosťami organizujú do špecificky lokalizovaných subpopulácií (PÁLKOVÁ a VÁCHOVÁ 2006). Biofilmy predstavujú vážny problém v zdravotníctve, pretože sú schopné adherovať na rôzne materiály a sú vysoko odolné voči pôsobeniu chemických látok a liečiv. Príkladom mnohobunkovej štruktúry vyskytujúcej sa v prírode sú kolónie. Kooperácia kvasinkových buniek a ich rast v rámci komunity umožňuje prežívanie v nepriaznivých podmienkach vonkajšieho prostredia, v prípade patogénov prispieva k úspešnej kolonizácii hostiteľského tkaniva a umožňuje efektívnu obranu voči odpovedi imunitného systému (DONLAN a COSTERTON 2002, PÁLKOVÁ 2004). Pre tvorbu komplexných hubových biofilmov je esenciálna adhézia buniek k povrchom, produkcia extracelulárnej matrix (ECM), transportéry v plazmatickej membráne patriace do skupiny tzv. „multidrug resistance“ transportérov a špecializovaná subpopulácia stacionárnych buniek, ktoré sú omnoho odolnejšie voči stresu (DOUGLAS 2003, BLANKENSHIP a MITCHELL 2006, VÁCHOVÁ a kol. 2011). Na rozdiel od tekutých kultúr, vznikajú v mikrobiálnych mnohobunkových štruktúrach gradienty rôznych živín, metabolitov, odpadových produktov, signálnych molekúl a plynov, čím pripomínajú bunky vysoko organizovaných a diferencovaných tkanív „pravých“ mnohobunkových organizmov (ČÁP a kol. 2012).

V porovnaní s hladkými kolóniami laboratórnych kmeňov vytvárajú „divoké“ kmene *S. cerevisiae* štruktúrované kolónie s vlastnosťami podobnými biofilmom húb, čo im umožňuje prežívať v nehostinných podmienkach prostredia. Pre biofilm kolónie kvasiniek je charakteristická produkcia ECM bohatej na polysacharidy, schopnosť udržiavať vysoký podiel vody a produkcia adhézneho proteínu Flo11p, ktorý je nevyhnutný pre adhéziu k substrátu a vytvorenie vzdušnej, štruktúrovanej 3D architektúry kvasinkovej kolónie (ŠŤOVÍČEK a kol. 2010, VOPÁLENSKÁ a kol. 2010).

2.1.1 Charakteristika proteínu Flo11p u *S.cerevisiae*

Proteín Flo11p patrí do skupiny povrchových flokulínov a podmieňuje schopnosť kvasinkových buniek adherovať k ostatným bunkám a pevným podkladom. Ide

o extracelulárny proteín, ktorého N-terminálna doména je dôležitá pre adherovanie, glykozylovaná centrálna doména je bohatá na Ser/Thr a C-terminálna hydrofóbna doména viazaná do membrány glykozylfosfatidylinozitolovou (GPI) kotvou slúži na prenos signálu. Flo11p je dôležitý pre tvorbu pseudohýf u diploidov a invazívny rast haploidov v čase limitácie dusíka a glukózy ako hlavných zdrojov živín (LO a DRANGINIS 1998). Podieľa sa na filamentárnom raste (LAMBRECHTS a kol. 1996), tvorbe povlakov a biofilmov (REYNOLDS a FINK 2001). Expresia génu *FLO11* koreluje s morfológiou kolónie – najvyššia expresia génu *FLO11* je u najvýraznejšie štruktúrovaných kolónií a jeho delécia vedie ku strate schopnosti tvoriť vrásčité kolónie (ŠŤOVÍČEK a kol. 2010). Na rozdiel od niektorých prírodných kmeňov *S. cerevisiae*, Flo11p nie je produkovaný veľkou časťou laboratórnych kmeňov, pravdepodobne v dôsledku mutácie v géne *FLO8* podieľajúcom sa na jeho regulácii (LIU a kol. 1996).

2.2 Dôvod výberu génu *HAC1*

Ako už bolo spomínané, na štúdium morfogenézy štruktúrovaných kvasinkových kolónií bol okrem kmeňa BR-F využitý aj jeden zo získaných portugalských vinárskych kmeňov, ktorý v práci označujem ako kmeň PORT. Kmeň PORT vytvára na pevnom komplexnom médiu s 3% glycerolom ako zdrojom uhlíka hladké až polovrásčité kolónie. Pri charakterizácii tohto kmeňa z morfologického a fyziologického hľadiska bol RNDr. Schierovou, PhD. vysievaný i na rôzne typy inhibičných médií. Jeho výsev na médium s nízkou koncentráciou selénanu sodného (0,05 mmol Na₂SeO₄) ukázal, že v jeho prítomnosti dochádza u kmeňa PORT k indukcii tvorby vrásčitých, štruktúrovaných kolónií. Táto koncentrácia nepôsobí toxicky, pretože prírastok biomasy je v prítomnosti selénanu v danej koncentrácii vyšší než u kultúry rastúcej na GM (médium s 3% glycerolom). Mechanizmus pôsobenia selénanu sodného na morfogenézu kolónií „divokého“ kmeňa PORT je predmetom intenzívneho štúdia v laboratóriu RNDr. Schierovej, PhD.

Selénan sodný je vysoko toxická sodná soľ kyseliny selénovej, ktorá je významným zdrojom selénu (Se). V ľudských bunkách predstavuje selén esenciálny stopový prvok prítomný predovšetkým vo forme selénocysteínu v selénoproteínoch (BROZMANOVÁ a kol. 2010) a je súčasťou enzýmov chrániacich makromolekuly pred oxidáciou voľnými kyslíkovými radikálmi (ROS) a pod. Vo vysokej koncentrácii je však toxický a spôsobuje vznik oxidatívneho stresu a poškodenie DNA (SPALLHOLZ 1997, BROZMANOVÁ a kol. 2010). U kvasiniek je efekt selénu závislý na koncentrácii (viď ďalej). Napríklad seleničitan sodný pôsobí toxicky na kvasinkové bunky v podstatne vyšších koncentráciách (rádovo mM)

než na cicavčie bunky (rádovo μM) (prevzaté z PINSON a kol. 2000). Dôvodom môže byť to, že v kvasinkových bunkách nie sú zdroje selénu efektívne transportované, príp. prebieha veľmi účinná selénová detoxifikácia (STRATFORD a ROSE 1986).

S. cerevisiae je vhodným modelom štúdia vplyvu selénovej toxicity, pretože kvasinky nemajú selénoproteíny a Se pre ne nie je esenciálny. V literatúre sa popisuje hlavne toxický vplyv selenidu (H_2Se), vznikajúceho z prírodne prítomného seleničitanu (SeO_3^{-2}), na metabolizmus *S. cerevisiae*. Autori však pracujú s podstatne vyššími koncentráciami zlúčenín selénu, čo môže viesť k jeho toxickému účinku a jeho vplyv sledujú po kratšom časovom intervale (rádovo niekoľko minút – hodín), než my v laboratóriu RNDr. Schierovej, Ph.D.

PINSON a kol. (2000) sledovali rast kvasinky *S. cerevisiae* v tekutom kultivačnom YEPD médiu (komplexné kvasinkové médium) pri teplote $30\text{ }^\circ\text{C}$ a rôznych koncentráciách seleničitanu sodného (1 mM, 2 mM, 5 mM). Čím bola koncentrácia vyššia, tým bol exponenciálny rast pomalší a nižšie percento buniek vstupovalo do stacionárnej fázy rastu. To môže byť spôsobené buď spomalením, príp. zastavením bunkového cyklu alebo významným zvýšením letality v bunkovej populácii (PINSON a kol. 2000). Prítomnosť 1 mM seleničitanu sodného v tekutom kultivačnom médiu zvýšila frekvenciu mutácií súvisiacich s posunom čítacieho rámca (delécie 1-4 bp) (LETAVAYOVÁ a kol. 2008). Seleničitan zohráva pravdepodobne úlohu ako oxidačný agens, ktorý produkuje superoxid a spôsobuje oxidatívne poškodenie DNA, vznik zlomov dsDNA a bunkovú smrť (PINSON a kol. 2000, LETAVAYOVÁ a kol. 2008). IZQUIERDO a kol. (2010) zistili, že prítomnosť 6 mM seleničitanu sodného (tekuté YEPD médium, $30\text{ }^\circ\text{C}$) spôsobuje stratu membránovej integrity v počiatočnej fáze rastu (do 24h) a hyperkarbonyláciu proteínov indukujúcu ich oxidatívne poškodenie. Po 24 h inkubácie sa ukázalo, že seleničitan spôsobuje abnormálnu morfológiu jadra a objavujú sa voľné 3'-OH konce molekuly DNA, čo je jedným z apoptotických znakov kvasinkových buniek (IZQUIERDO a kol. 2010). Štúdie transkriptómu ukázali, že v jeho prítomnosti (1 mM, tekuté YEPD médium, $30\text{ }^\circ\text{C}$) dochádza ku zvýšenej expresii génov zahrnutých vo vysokoafinitnom transporte Fe a génov odpovede na stres a degradáciu proteínov (SALIN a kol. 2008).

FUJS a kol. (2009) študovali vplyv selénanu (0,04 mM, 0,4 mM, 4 mM Na_2SeO_4 , tekuté YEPD médium, $28\text{ }^\circ\text{C}$) na metabolizmus kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* a odhalili kľúčovú úlohu enzýmu ATP sulfurylázy v prooxidačných vlastnostiach selénanu. ATP sulfuryláza *S. pombe* i *S. cerevisiae* je primárne enzým dôležitý pre asimiláciu síranu, ale nerozlišuje medzi síranom a selénanom (CHEREST a kol. 1985, ULLRICH a HUBER 2001, FUJS a kol. 2009). Kmene *S. pombe* s aktivovanou ATP sulfurylázou vytvárali zo

selénanu adenozin 5'-fosfoselénan, ktorý je redukovaný na toxický seleničitan s inhibičným vplyvom na rast. Seleničitan je ďalej redukovaný buď na selenid (H_2Se) alebo elementárny selén (Se). Tieto redukcie vedú v bunke k indukcii oxidatívneho stresu, vznikajú ROS, mení sa aktivita enzýmov odbúravajúcich ROS a znižuje sa intracelulárny obsah redukovanej formy glutationu. Viabilita buniek sa znižovala so zvyšujúcou sa koncentráciou selénanu v médiu. Kmene so slabou ATP sulfurylázou sú k selénanu odolnejšie (FUJS a kol. 2009).

S cieľom objasniť mechanizmus pôsobenia selénanu u kmeňa *S. cerevisiae* PORT bola pomocou mikroarrayovej analýzy porovnaná génová expresia v kultúre rastúcej na selénane a na GM, resp. génová expresia vrásčitých a polovrásčitých kolónií starých 3, 4 a 6 dní (SCHIEROVÁ, zatiaľ nepublikované). Normalizované dáta boli štatisticky spracované analýzami DAVID a SPELL, ktoré umožnili vytipovať funkčné skupiny génov, ktorých expresia je zmenená štatisticky významne.

Nižšie popísané zmeny sú uvedené z pohľadu kultúry rastúcej v prítomnosti selénanu v porovnaní s kultúrou rastúcou na glycerolovom médiu bez selénanu. Nápadné zmeny v expresii vykazovali sporulačné gény (*SPS4*, *SPR287*, *SSP2*, *SPO19*, *SPS1*, *SPO73*, *YLR054C*) zvýšené v kultúre rastúcej na selénane vo veku 3 a 4 dni. Zvýšená bola i expresia génov pre proteíny extracelulárnej domény a transportné proteíny. Okrem toho bola zmenená expresia génov stresovej odpovede - nie len pre proteíny teplotného šoku (Hsp, z angl. heat shock proteins), ale i pre proteíny odpovede na poškodenie DNA. U trojdennej a šesťdennej kultúry bola výrazne znížená expresia génov pre fosfoproteíny a oxidoredukčné reakcie. U štvordennej kultúry bola znížená expresia génov špecifických pre autofágiu. U šesťdennej kultúry bola znížená expresia génov pre proteazomálnu degradáciu proteínov. Zistené dáta majú iba orientačný charakter a boli použité pre výber génov na ďalšiu analýzu.

Podľa analýzy SPELL bola časť génov so zmenenou expresiou v prítomnosti selénanu závislá na transkripčnom faktore Hac1p, ktorý je kľúčovým proteínom UPR. Preto bol gén *HAC1* jedným z kandidátnych génov s morfogenetickým účinkom, hoci úroveň jeho exprese bola porovnateľná u oboch kultúr. Delícia génu viedla u kmeňa PORT ku strate schopnosti tvoriť vrásčité kolónie v prítomnosti selénanu.

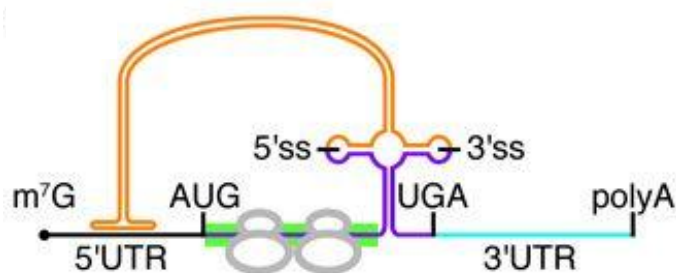
2.3 Charakteristika génu *HAC1* a proteínu Hac1p u *Saccharomyces cerevisiae*

Gén *HAC1* je u *S. cerevisiae* lokalizovaný na chromozóme VI a v literatúre sa s ním môžeme stretnúť i pod názvom *ERN4* a *IRE15*. Kóduje transkripčný faktor z proteínovej rodiny obsahujúcej motív bázičného leucínového zipsu (bZIP), ktorý sa vo forme homodiméru viaže do oblasti promótorov génov s tzv. UPR elementom (UPRE) zapojených

do UPR (bunková odpoveď na prítomnosť nezbalených proteínov, z angl. Unfolded Protein Response) a aktivuje ich transkripciu (MORI a kol. 1996). Mechanizmus indukcie UPR ako odpovede na stres v ER je popísaný v kap. 2.4. UPRE je 22 bp dlhý promótorový element a obsahuje čiastočne palindromickú sekvenciu (CAGCGTG) (MORI a kol. 1992, MORI a kol. 1998).

Gén *HAC1* je u *S. cerevisiae* transkribovaný do prekursora mRNA *HAC1* s dĺžkou 969 nukleotidov. Jeho otvorený čítací rámec je prerušený intrónom dlhým 252 nukleotidov v pozícii 662-913. Tento intrón kóduje 10 aminokyselinových zbytkov a je ukončený stop kodónom UGA. Po zostrihnutí intrónu pri aktivácii UPR dôjde ku zmene čítacieho rámca a pôvodných 10 aminokyselinových zbytkov je na C-konci nahradených 18 aminokyselinami exónu II. Táto mRNA je následne translatovaná a vzniká Hac1p s dĺžkou 238 aminokyselinových zbytkov (COX a WALTER 1996, MORI a kol. 1996).

Za normálnych, nestresových podmienok tvorí intrón stabilnú sekundárnu štruktúru na základe bázoového párovania s 5'UTR (neprekladaná oblasť génu, z angl. untranslated region), čím sa udržiava nezostrihnutá mRNA *HAC1* translačne inaktívna (CHAPMAN a WALTER 1997, RUEGSEGGER a kol. 2001). Bázoové párovanie medzi intrónom a 5'UTR a konzervovaná sekvencia na 3'UTR sú nevyhnutné pre správnu lokalizáciu RNA *HAC1* ku membráne ER a pre nekonvenčný zostrih intrónu proteínom Ire1p počas aktivácie UPR (ARAGON a kol. 2009) (Obr. 1) (viď kap. 2.4).



Obr. 1. Schematické znázornenie mRNA *HAC1* kvasinky *S. cerevisiae*. Otvorený čítací rámec (ORF, z angl. Open Reading Frame) je tvorený dvomi exónmi. Intrón (v obr. oranžovou farbou) bázoovo páruje s 5'UTR (v obr. čiernou farbou) a tak bráni translácii, i keď väzba ribozómov je možná (v obr. šedou farbou). Ire1p zostriháva intrón v zostrihových miestach 5'ss a 3'ss. m⁷G - 5' čiapočka, AUG – štart kodón, UGA – stop kodón, poly A – polyadenylačný signál (prevzaté z ARAGON a kol. 2009).

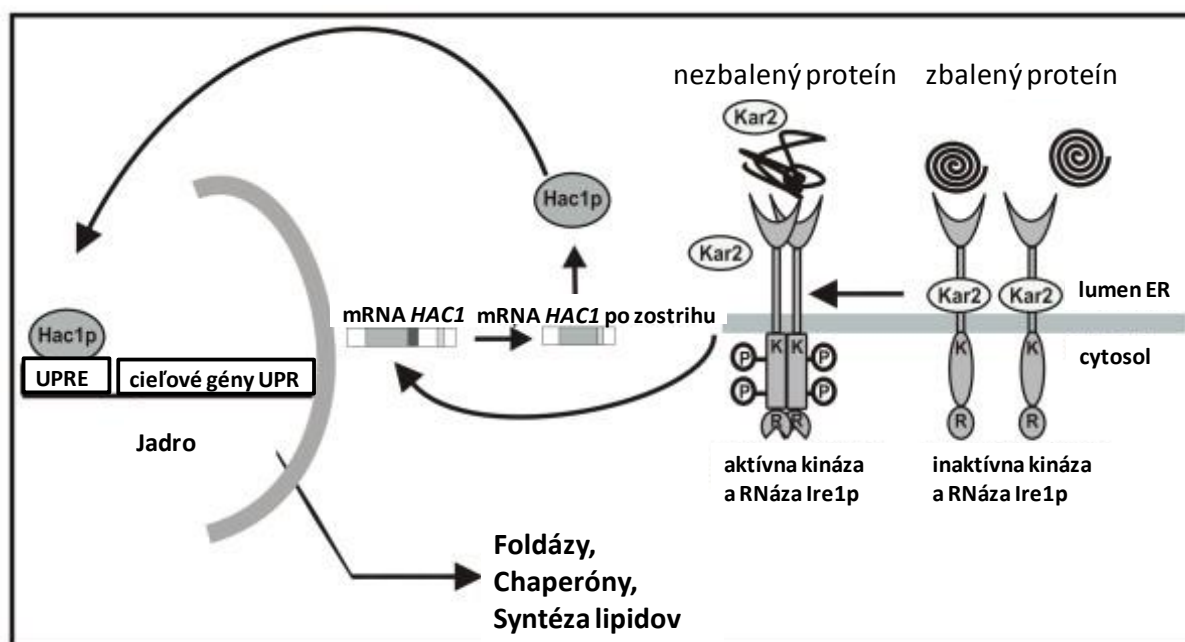
Nezostrihnutá mRNA *HAC1* asociuje s ribozómami, ale ku jej translácii nedochádza, resp. môže byť translatovaná príležitostne v malom množstve.

Expresia génu *HAC1* je regulovaná nielen na posttranskripčnej úrovni zostrihom intrónu mRNA *HAC1*, ale i na úrovni posttranslačnej polyubiquitinylnáciou C-konca Hac1p (COX a WALTER 1996, MORI a kol. 1996, RUEGSEGGER a kol. 2001).

2.4 Hac1p a bunková odpoveď na prítomnosť nezbalených proteínov u *S. cerevisiae*

Vo všetkých eukaryotických bunkách je ER hlavným miestom syntézy sterolov a lipidov, biosyntézy, zbaľovania, zostavovania, ko- a posttranslačných modifikácií väčšiny integrálnych membránových proteínov, proteínov bunkovej steny (u nižších eukaryot) a proteínov určených na sekréciu (LYNES a SIMMEN 2011, MANDON a kol. 2013). Narušenie týchto procesov môže byť spôsobené rôznymi faktormi, napr. chemickými látkami a mutáciami v génoch zahrnutých v kontrole kvality proteínov maturovaných v ER. Výsledkom je akumulácia nezbalených alebo nesprávne zbalených proteínov v lumene ER, čo sa súhrne označuje ako stres v ER (RON a WALTER 2007, VEMBAR a BRODSKY 2008). Pri odpovedi na stres v ER dochádza ku aktivácii signálnej dráhy označenej ako odpoveď na prítomnosť nesprávne zbalených proteínov (UPR, z angl. Unfolded Protein Response), pri ktorej sa indukuje komplexný program génovej expresie spojený so zvýšením schopnosti ER zbaľovať proteíny (RON a WALTER 2007).

U kvasinky *S. cerevisiae* je UPR aktivovaná transmembránovým proteínom ER, „receptorom“ stresu Ire1p. Proteín Ire1p obsahuje luminálnu senzorovú doménu a cytoplazmatickú proteín kinázovú / endoribonukleázovú doménu (COX a kol. 1993, MORI a kol. 1993). Za nestresových podmienok je Ire1p monomérny proteín asociovaný so chaperónom ER Bip/Kar2p (ZHOU a kol. 2006). Pri akumulácii nezbalených proteínov v lumene ER sa Bip/Kar2p uvoľní z Ire1p. Ire1p priamo interaguje s nezbalenými proteínmi, čo vyvolá oligomerizáciu luminálnej domény a následnú signálnu transdukciiu ku cytosolickej doméne cez postupné kroky autofosforylácie a oligomerizácie endoribonukleázovej domény. Výsledkom je aktivácia ribonukleázovej domény Ire1p (LEE a kol. 2008b, KORENNYKH a kol. 2009). Aktivovaný Ire1p iniciuje nekonvenčný zostrih intrónu mRNA *HAC1u* („u“ ako neindukovaný, z angl. „uninduced“) na dvoch špecifických miestach odlišných od konsenzu intrónových sekvencií rozpoznávaných spliceozómom (RUEGSEGGER a kol. 2001). Po zostrihu sú 5' a 3' terminálne štiepne produkty ligované pomocou tRNA ligázy Rlg1p a vzniká izoforma RNA *HAC1i* („i“ ako indukovaný, z angl. „induced“) (COX a WALTER 1996, KAWAHARA a kol. 1997). Zostrih intrónu umožní transláciu proteínu Hac1p, ktorý je translokovaný do jadra a aktivuje transkripciu celej rady génov kódujúcich proteíny dôležité pre potlačenie stresu v ER (TRAVERS a kol. 2000). V jadre sa Hac1p viaže na responzívne elementy UPR v promótoroch cieľových génov UPR (COX a WALTER 1996, MORI a kol. 1996) (Obr. 2).



Obr. 2. UPR u kvasinky *S. cerevisiae*. Za normálnych podmienok je Ire1p prítomný v membráne ER ako monomér asociovaný s Kar2p/Bip. Pri strese v ER, v prvom kroku, disociuje Kar2p z Ire1p, čo spôsobí tvorbu klastrov Ire1p v membráne ER. V druhom kroku dochádza k priamemu prepojeniu nesprávne zbaleného proteínu so senzorickou oblasťou Ire1p citlivou na stres, čo vedie ku aktivácii cytosolickej efektorovej domény (KIMATA a kol. 2007). Vytvorenie klastrov spôsobí transautofosforyláciu kinázovej domény (K) a aktiváciu endoribonukleázovej domény (R). Aktivácia Ire1p iniciuje nekonvenčný zostrih intrónu mRNA *HAC1*. Gén *HAC1* kóduje transkripčný faktor, ktorý aktivuje cieľové gény UPR – chaperóny, foldázy, proteíny syntézy lipidov atď. (upravené podľa GUERFAL a kol. 2010).

Gény aktivované UPR kódujú proteíny potrebné pre translokáciu, glykozyláciu a posttranslačné modifikácie proteínov, proteíny dôležité správne zbalovanie proteínov (chaperóny, proteíny tvoriace disulfidické väzby), proteíny potrebné pre degradáciu poškodených, nesprávne zbalených a posttranslačne modifikovaných proteínov (napr. proteíny ERAD - degradácie proteínov asociovaných s ER, z angl. ER-associated protein degradation), proteíny vezikulárneho transportu, proteíny cieľiace do vakuoly a proteíny biosyntézy bunkovej steny. Medzi gény aktivované UPR patria i gény metabolizmu lipidov a inozitolu, a to gény kódujúce proteíny metabolizmu mastných kyselín, biosyntézy hému, sfingolipidov, fosfolipidov a sterolového metabolizmu (TRAVERS a kol. 2000).

Delécia génu *IRE1* i *HAC1* vedie u *S. cerevisiae* k auxotrofii na inozitol. Celkovo sa pri strese v ER *S. cerevisiae* indukovanom tunikamycínom (inhibítor N-glykozylácie) alebo dithiothreitolom (inhibítor tvorby disulfidických väzieb) zvýši transkripcia minimálne 381 génov s otvoreným čítacím rámcom (TRAVERS a kol. 2000).

Bunka so stresom vyvolaným v ER sa snaží znížiť množstvo abnormálne zbalených či poškodených proteínov zvýšením expresie génov kódujúcich chaperóny, glykozylačné

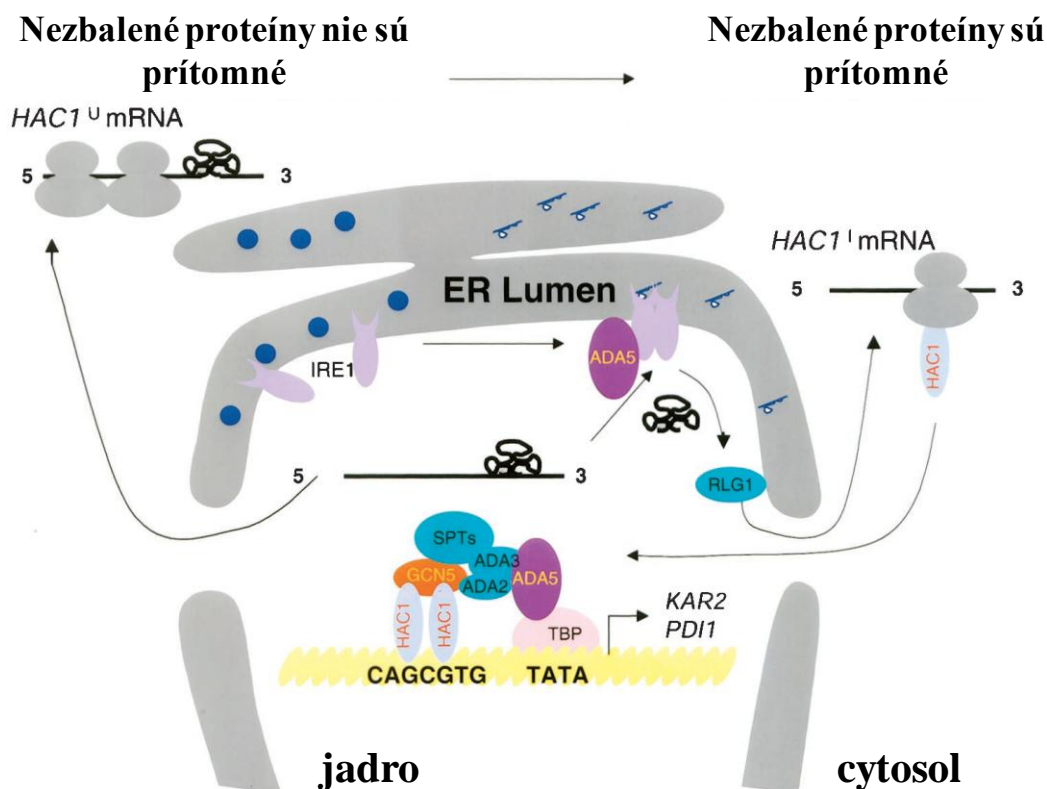
a modifikačné enzýmy lokalizované v ER, ktoré im umožnia zaujať natívnu konformáciu (TRAVERS a kol. 2000). Ďalšou možnosťou je zvýšenie rýchlosti odstraňovania nesprávne zbalených proteínov zvýšením anterográdného membránového transportu alebo ich translokácia z ER do cytosolu, kde sú degradované v proteazómoch. Tento mechanizmus sa označuje ako degradácia proteínov asociovaných s ER (ERAD) (prevzaté z VEMBAR a BRODSKY 2008). Alternatívnym mechanizmom degradatívnej odpovede je autofágia, v rámci ktorej dochádza ku degradácii poškodených organel, napr. i ER. Bolo zistené, že medzi cieľové gény UPR patria okrem chaperónov ER a modifikačných enzýmov i mnohé komponenty sprostredkovávajúce ERAD a autofágiu (TRAVERS a kol. 2000, BERNALES a kol. 2006, YORIMITSU a kol. 2006).

Ako už bolo spomínané, medzi gény aktivované UPR patria i gény metabolizmu lipidov a inozitolu (TRAVERS a kol. 2000). Pri indukcii UPR dochádza ku zväčšeniu plochy membrán ER, čo vyžaduje zvýšenie koncentrácie fosfolipidov v bunke. V bunkách s deléciou génu *HAC1* alebo *IRE1* nedochádza ku zväčšeniu ER (TRAVERS a kol. 2000, BRICKNER a WALTER 2004, SCHUCK a kol. 2009). Modelovým génom pre sledovanie vplyvu UPR na aktiváciu syntézy fosfolipidov je gén *INO1*, kódujúci inozitol 3-fosfát syntázu. Za normálnych, nestresových podmienok (pri dostatku inozitolu) je reprimovaný väzbou transkripčného faktora (TF) Opi1p na jeho pozitívne TF Ino2p a Ino4p. Po aktivácii UPR dochádza k uvoľneniu Opi1p z komplexu Ino2/4 a k zahájeniu transkripcie *INO1* (BRICKNER a WALTER 2004).

Stres v ER je častou príčinou stresu v bunkovej stene a naopak. Pri vzniku stresu v bunkovej stene (teplotný stres, hypoosmotický šok, oxidatívny stres, prítomnosť feromónu kvasinky opačného párovacieho typu a pod.) je aktivovaná dráha CWI-MAPK (z angl. the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase pathway), ktorá indukuje gény podieľajúce sa na obnove bunkovej steny, ale i UPR (CHEN a kol. 2005, NUNEZ a kol. 2008, SCRIMALE a kol. 2009). Hlavným TF dráhy CWI-MAPK je Rlm1p, ktorý aktivuje transkripciu génov kódujúcich enzýmy zahrnuté v organizácii a biosyntéze bunkovej steny. Pri nedostatku inozitolu alebo pri narušení syntézy fosfolipidov je aktivovaná dráha CWI-MAPK, vrátane TF Rlm1p. Bunky s deléciou *MPK1*, ktorý kóduje finálnu MAP kinázu dráhy CWI-MAPK aktivujúcu Rlm1p, akumulujú zvýšené množstvo fosfatidylcholínu (NUNEZ a kol. 2008).

2.5 Modulácia UPR histón acetyltransferázovým komplexom SAGA a Ypt1p

WELIHINDA a kol. (2000) preukázali, že zostrih mRNA *HAC1* *in vitro* vyžaduje iba Ire1p a ligázu Rlg1p, *in vivo* je však pre Ire1p/Rlg1p-dependentný zostrih nevyhnutný i Ada5p (alias Spt20p). Proteín Ada5p je komponentou SAGA (Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferáza) histón acetyltransferázového komplexu, pričom priamo interaguje s Ire1p (GRANT a kol. 1998) (Obr. 3).



Obr. 3. Aktivácia UPR *in vivo* je u kvasinky *S. cerevisiae* funkčne podmienená komplexom SAGA. Ire1p je lokalizovaný predovšetkým v membráne ER, ale malá subpopulácia Ire1p je lokalizovaná i vo vnútornej jadrovej membráne a jadrových pórových komplexoch (TIRASOPHON a kol. 1998). To predpokladá cytoplazmatickú a nukleoplazmatickú lokalizáciu C-terminu Ire1p, zostrih mRNA *HAC1u* v jadrovom obale a transport *HAC1i* do cytosolu na transláciu. Ligáza Rlg1p je prítomná i v jadrovom pórovom komplexe (CLARK a ABELSON 1987). Ada5p je nevyhnutný pre Ire1p/Rlg1p-dependentný zostrih mRNA *HAC1u*. Na obrázku je naznačená aktivácia transkripcie génu *KAR2* kódujúceho chaperón a modifikačného enzýmu *PDI1* (upravené podľa WELIHINDA a kol. 2000).

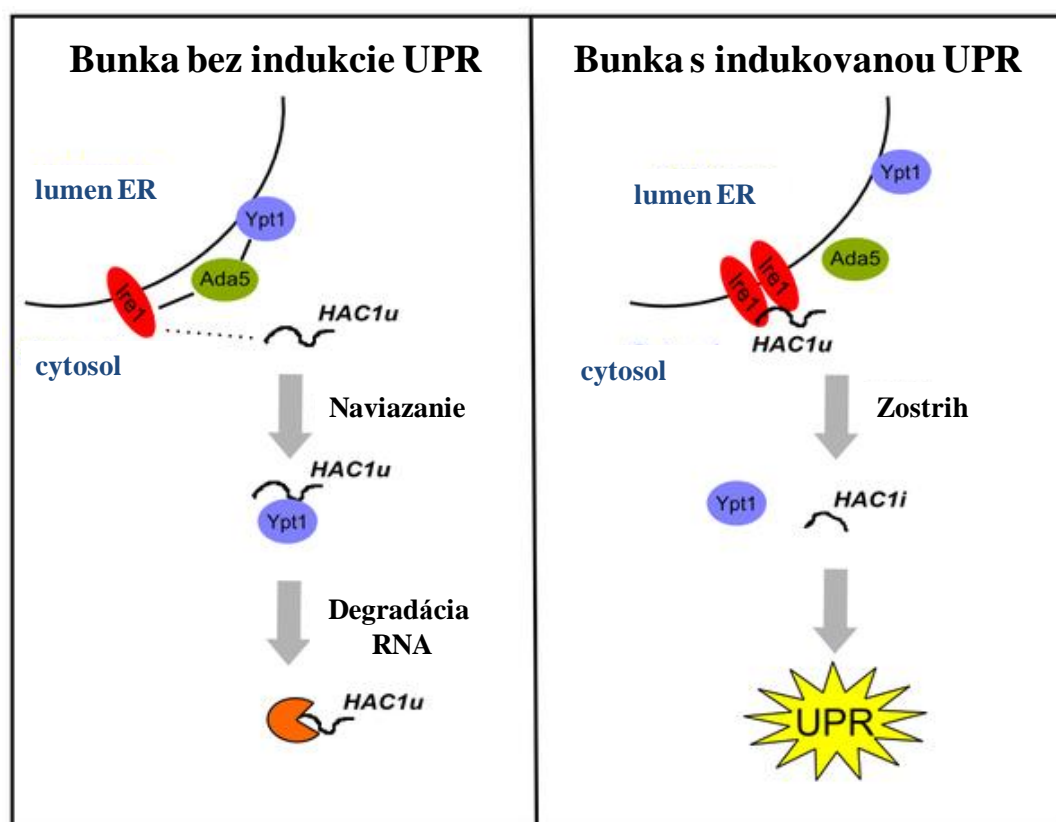
Histón acetyltransferázový komplex SAGA, u *S. cerevisiae* tvorený Gcn5p, Hfl1p, Ada2p, Ada3p, Spt20p, Spt3p a Spt7p, je multiproteínový komplex (1,8 MDa) podieľajúci sa na acetylácii histónov (SHAHBAZIAN a GRUNSTEIN 2007, KOUTELOU a kol. 2010). Reguluje transkripciu stresových génov, zvyšuje hladinu RNA polymerázy II (GOVIND a kol. 2007) a je lokalizovaný na aktívnych promótoroch na úrovni, ktorá koreluje s ich aktivitou (ROBERT a kol. 2004). Transkripčné koaktívatory, ktoré sú súčasťou komplexu

SAGA, sú v eukaryotických bunkách dôležité pre funkčnú interakciu medzi aktivátormi viažucimi sa do aktivačných sekvencií v „upstream“ oblasti promotóra génu a bazálnymi faktormi viažucimi sa do TATA boxu (prevzaté z WELIHINDA a kol. 2000). Prostredníctvom Ada5p a Ada2p interaguje transkripčný koaktivátor Gcn5p s Ire1p a na základe jeho histón acetyltransferázovej aktivity rozvoľňuje chromatinovú štruktúru vedúcu ku transkripčnej aktivácii. Gcn5p priamo interaguje s Hac1p, čo zosilňuje indukciu cieľových génov UPR (WELIHINDA a kol. 1997). Kmene *S. cerevisiae* s deléciou *GCN5*, *ADA2* a *ADA3* majú narušenú histón acetyltransferázovú aktivitu spojenú s čiastočným defektom v transkripčnej aktivácii génov kódujúcich chaperóny pri odpovedi na stres v ER. Bunky s deléciou *ADA5* však nie sú vôbec schopné aktivácie UPR (WELIHINDA a kol. 1997). Ada5p, interagujúci s Ire1p, sa tak uplatňuje nielen pri transkripčnej aktivácii génov UPR, ale je taktiež nevyhnutný pre zostrih mRNA *HAC1*. Tieto výsledky poukazujú na vzájomné prepojenie procesov transkripčnej koaktivácie a posttranskripčných úprav mRNA (WELIHINDA a kol. 2000).

Aktivácia UPR je regulovaná posttranskripčne nielen na úrovni nekanonického zostrihu mRNA *HAC1*, ale i špecifickou interakciou mRNA *HAC1* s malými Ras GTPázami z rodiny Ypt. TSVETANOVA a kol. (2012) charakterizovali interakciu mRNA *HAC1* s Ypt1p. Proteín Ypt1p je esenciálnou malou regulačnou GTPázou a homológom Rab1p, ktorý je dôležitý pre správne cieľovanie váčkov pri vezikulárnom transporte. Ypt1p taktiež plní úlohu v sekrečnej dráhe, kde je centrálnym regulátorom transportu z ER do Golgiho komplexu (JEDD a kol. 1995). *In vivo* je Ypt1p špecificky asociovaný s nezostrihnutou mRNA *HAC1*. K prerušeniu tejto interakcie dochádza v prítomnosti nezbalených a nesprávne zbalených proteínov v ER, čo indukuje UPR. Interakcia s Ypt1p reguluje stabilitu mRNA *HAC1* a zohráva úlohu pri kinetike UPR. Zníženie expresie Ypt1p viedlo k zníženému rozpadu mRNA *HAC1*, čo výrazne zvýšilo hladinu zostrihutej i nezostrihutej mRNA *HAC1* a oneskorilo atenuáciu UPR po vymiznutí stresu v ER. Ypt1p podieľajúci sa na rozpade mRNA *HAC1* tak prispieva k regulácii UPR a vzájomne prepája a reguluje mechanizmy vezikulárneho transportu, UPR a homeostázy v ER (Obr. 4) (TSVETANOVA a kol. (2012).

Ako už bolo spomínané, na úpravu nezostrihutej mRNA *HAC1* pri indukcii UPR je nevyhnutný nielen Ire1p zostrihujúci RNA *HAC1*, ale i Ada5p. Ire1p navádza mRNA *HAC1u* ku ER. Ada5p pravdepodobne navádza Ypt1p do blízkosti Ire1p, čo umožní väzbu Ypt1p k mRNA *HAC1* (Obr. 4). V mutantných kmeňoch *ire1Δ* a *ada5Δ* došlo ku strate interakcie medzi Ypt1p a mRNA *HAC1*. Stále však nie je jasné, či je interakcia medzi Ypt1p

a mRNA *HAC1* priama alebo nepriama a pravdepodobne to súvisí i s nukleotidovým stavom GTPázy Ypt1p (Ypt1p - GTP/GDP) (TSVETANOVA a kol. (2012).



Obr. 4. Schéma negatívnej regulácie expresie mRNA *HAC1u* („u“ ako neindukovaný, z angl. „uninduced“) proteínom Ypt1p. Za normálnych rastových podmienok (ľavý panel) Ire1p (na obrázku červenu) navádza *HAC1u* ku membráne ER. Proteín Ada5p navádza Ypt1p do blízkosti Ire1p, čo umožní väzbu Ypt1p k *HAC1u*. Ypt1p reguluje expresiu mRNA *HAC1* jej destabilizáciou a navádzaním ku RNA degradačnému komplexu. Pri indukcii UPR (pravý panel) sa naruší interakcia GTPázy Ypt1p s *HAC1u*. Ire1p zotrihne *HAC1u*, maturovaná *HAC1i* („i“ ako indukovaný, z angl. „induced“) je translatovaná a aktivuje odpoveď na stres v ER (upravené podľa TSVETANOVA a kol. 2012).

2.6 Odpoveď na stres v ER u iných druhov húb

U húb je odpoveď na stres v ER indukovaná jednak klasickým spôsobom, ako je popísaný u kvasinky *S. cerevisiae*, ale nájdeme i alternatívne mechanizmy, v rámci ktorých UPR zostrihom aktivovaná nie je – tieto príklady budú uvedené nižšie v tejto kapitole.

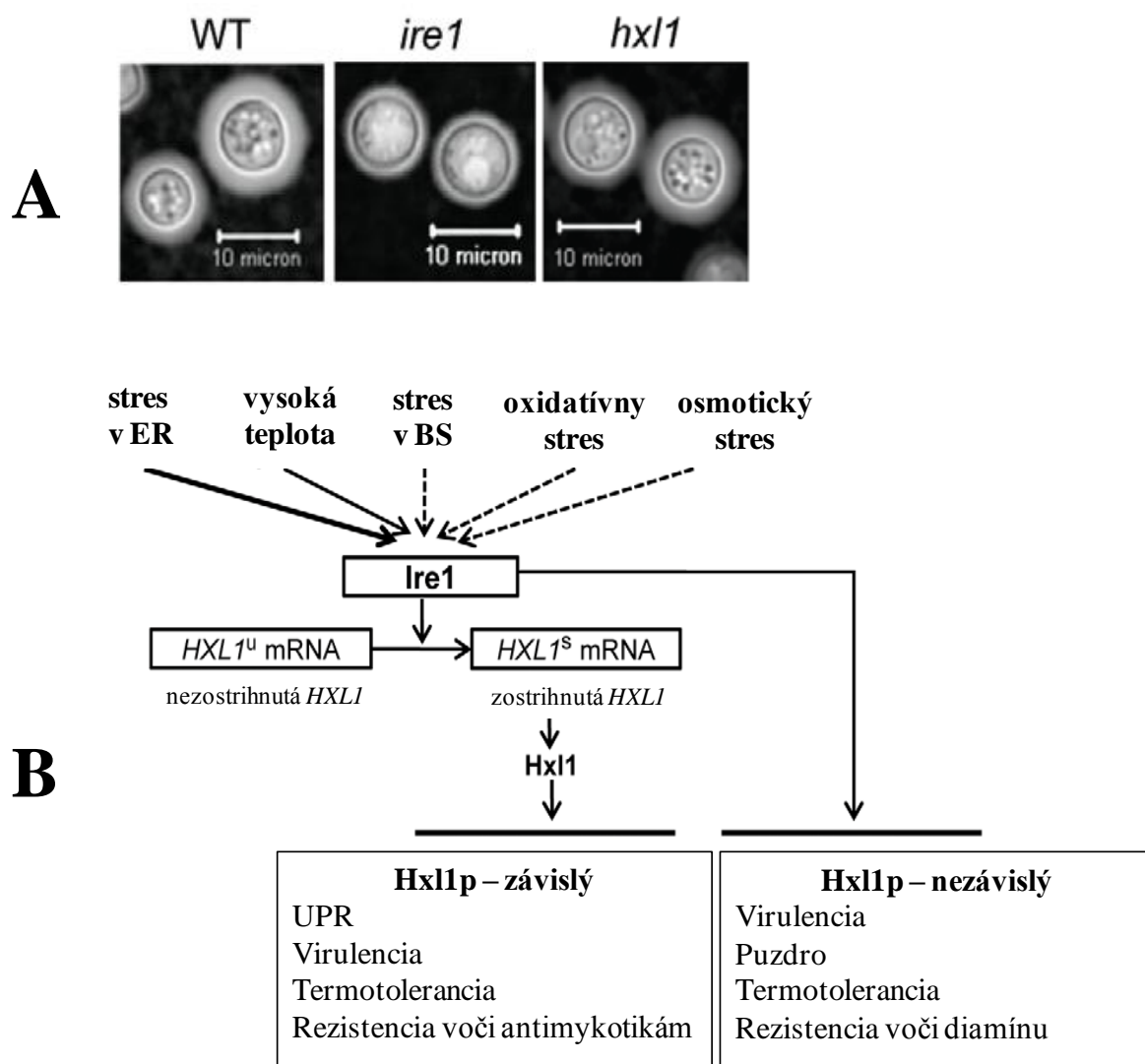
Homológy génu *HAC1* *Saccharomyces cerevisiae* boli identifikované u cicavcov (*XBPI*), *Caenorhabditis elegans* (*XBPI*), u kvasinky *Candida albicans* (*HAC1*) i filamentárnych húb ako *Cryptococcus neoformans* (*HXL1*) a *Aspergillus fumigatus* (*HACA*).

Aktivácia UPR je u týchto organizmov spojená so zostrihom nezávislým na spliceozóme, homológy Ire1p a Hac1p sú zodpovedné za potlačenie stresu v ER (WIMALASENA a kol. 2008, RICHIE a kol. 2009, CHEON a kol. 2011, FENG a kol. 2011).

Rozdiel medzi spomínanými druhmi húb je napr. v dĺžke intrónu homológa *HAC1* – u *S. cerevisiae* má dĺžku 252 bp (COX a WALTER 1996, MORI a kol. 1996), u kvasinky *C. albicans* 19 bp, 20 bp u filamentárnej huby *A. fumigatus*. Homológ génu *HAC1* u *C. neoformans* (*HXL1*) má v „upstream“ oblasti konvenčný intrón s dĺžkou 55 bp a v „downstream“ oblasti nekonvenčný intrón s dĺžkou 56 bp (SALOHEIMO a kol. 2003, MULDER a kol. 2004, CHEON a kol. 2011). UPR súvisí s patogenitou húb *C. neoformans*, *C. albicans* i *A. fumigatus* a fungicídnu rezistenciou. Na základe výsledkov z posledných rokov sa UPR stáva atraktívnym predmetom štúdia predovšetkým v súvislosti s progresom v antimykotickej terapii.

Cryptococcus neoformans – tento ľudský patogén patrí medzi bazídiomycéty a spôsobuje život ohrozujúce meningoencefalitídy. Do UPR má zapojený evolučne konzervovaný *IRE1* a bZIP transkripčný faktor *HXL1* (*HAC1 and XBP1-Like gene 1*). *HXL1* nie je sekvenčne homológny s *HAC1/XBP1*, pri rôznych stresových podnetoch sa však UPR aktivuje jeho nekonvenčným zostrihom pomocou Ire1p. Na rozdiel od *S. cerevisiae* je 20-30% mRNA *HXL1* prítomná za nestresových podmienok v zostrihnutej forme, čo indukuje čiastočnú aktiváciu UPR i za normálnych podmienok. Po indukcii stresu v ER sa do zostrihnutej formy konvertuje viac ako 80% mRNA *HXL1*. Pri meraní transkripčnej úrovne génov regulovaných UPR a porovnaní rodičovského kmeňa s mutantnými kmeňmi sa ukázalo, že ich transkripcia je závislá na Ire1p, ale nemusí byť závislá na Hxl1p. Z toho vyplýva, že strata *IRE1 / HXL1* má odlišný efekt na expresiu určitej skupiny génov odpovede na stres v ER (Obr. 5B).

Mutanty *ire1* a *hxl1* s génovou disrupciou vykazujú extrémne rastové defekty pri fyziologickej teplote 37 °C a sú avirulentné u myší. Pri kultivácii mutantných kmeňov *ire1* a *hxl1* na pevnom DME (z angl. Dulbecco's modified Eagle's medium), médiu špecifickom pre tvorbu puzdra, sa ukázalo, že *ire1* mutanty majú defekt v biosyntéze puzdra. Antifagotické puzdro a antioxidant melanín sú dvoma hlavnými virulentnými faktormi *C. neoformans*. Biosyntéza puzdra u *hxl1* kmeňa sa podľa kvalitatívnych i kvantitatívnych meraní od rodičovského kmeňa nelíšila (Obr. 5A), čo zrejme súvisí s tým, že fyziologická funkcia Ire1p môže byť na Hxl1p závislá i nezávislá. Tvorba puzdra je Hxl1p nezávislá (Obr. 5B). Produkcia melanínu nebola narušená ani u jednej mutanty (CHEON a kol. 2011).

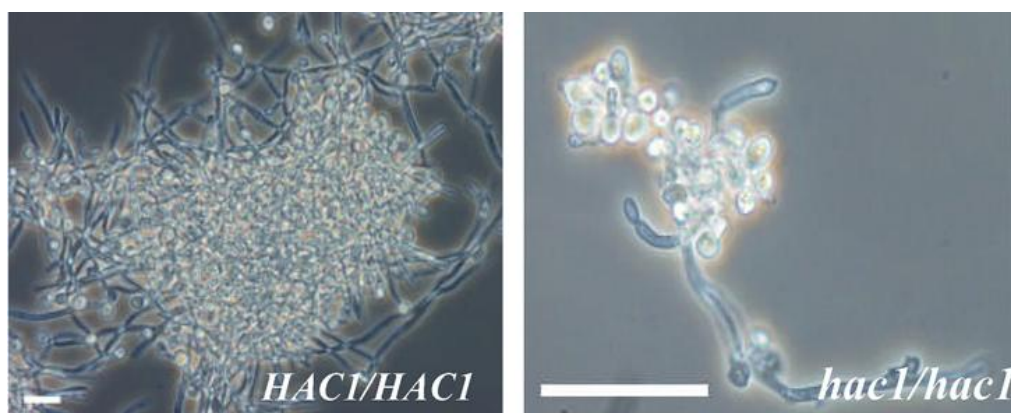


Obr. 5. A - Mutantný kmeň *ire1* *C. neoformans* vytvára menšie puzdro. Biosyntéza puzdra u kmeňa *hxl1* je porovnateľná s „divokým“ kmeňom (WT). Kolónie sú staré 2 dni, kultivované na pevnom DME (z angl. Dulbecco's modified Eagle's medium), médiu špecifickom pre tvorbu puzdra, pri teplote 30 °C.

B - Predpokladaná úloha dráhy UPR pri odpovedi na rôzne induktory stresu u *C. neoformans*. Fyziologická funkcia Ire1p je závislá i nezávislá na Hxl1p. BS = bunková stena (upravené podľa CHEON a kol. 2011).

Candida albicans – tento ľudský patogén spôsobuje rôzne závažné kandidózy, kolonizuje sliznice a u imunitne deficientných jedincov môže vyvolať i celkovú orgánovú sepsu (CALDERONE 2002). Je schopná dimorfnej tranzície – môže rásť vo forme kvasinkových buniek, pseudohýf i pravých hýf v závislosti na podmienkach prostredia (SUDBERY a kol. 2004). Kvasinková forma umožňuje rozšírenie infekcie v krvi, rozvoj hýfálnej formy je spojený s invazívnym rastom a tvorbou biofilmov (GOW a kol. 2002, SUNDSTRÖM 2006). WIMALASENA a kol. (2008) zistili, že delécia *HAC1* *C. albicans* (homológ *HAC1* *S. cerevisiae*) vedie ku redukcii tvorby hýf z 80 % na 14 % a tak významne redukuje polarizovaný rast buniek dôležitý pre virulenciu. Kmeň s deléciou génu *HAC1* tvoril

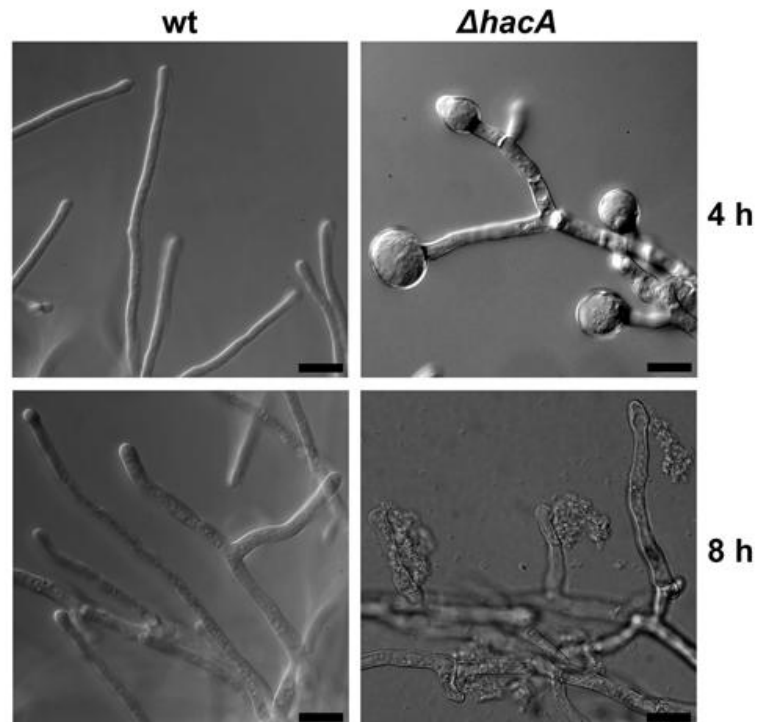
menšie a menej „lepkavé“ zhluky buniek, čo je pravdepodobne spôsobené inaktiváciou funkcie adhezínov na bunkovom povrchu (Obr. 6).



Obr. 6. Porovnanie schopnosti tvorby zhlukov „divokého“ kmeňa *Candida albicans* (*HAC1/HAC1*) a kmeňa s deléciou génu *HAC1* (*hac1/hac1*). Mutantný kmeň *hac1/hac1* tvorí menšie a menej „lepkavé“ zhluky buniek. Bunky 8 h staré, kultivované na YEPD médiu s 20% (v/v) obsahom séra, pri 37 °C. Biela mierka zodpovedá 20 µm (prevzaté z WIMALASENA a kol. 2008).

Analýza transkriptómu buniek vystavených stresu v ER preukázala zvýšenú expresiu génov zahrnutých v sekrécii, vezikulárnom transporte, stresovej odpovedi a biogenéze bunkovej steny a zníženú expresiu génov dôležitých pre transláciu a biogénu ribozómov. Mutanty *ire1Δ* sú hypersenzitívne na kaspofungín (BLANKENSHIP a kol. 2010).

Aspergillus fumigatus – je v pôde žijúca patogénna filamentárna huba, ktorá sa inhaláciou konídií (spór) dostáva do pľúc, kde vytvára hyfálnu formu. Sekretuje hydrolázy, čo jej počas infekcie umožňuje získavať živiny. Účinkom hydroláz dochádza k progresívnemu poškodeniu dýchacieho epitelu (FILLER a SHEPPARD 2006, UPTON a kol. 2007). U *A. fumigatus* bol popísaný HacAp, homológ Hac1p *S. cerevisiae*, ako hlavný transkripčný regulátor UPR. Kmene s deléciou *HACA* neboli schopné sekretovať veľké množstvo proteínov, čo znížilo virulenciu *A. fumigatus* u myší. Delécia *HACA* taktiež viedla k narušeniu integrity bunkovej steny a znížila rýchlosť rastu pri teplote 45 °C. Po 4 h inkubácie pri zvýšenej teplote dochádzalo k „opúchaniu“ apexu hýf a po 8 h bolo možné pozorovať lýzu buniek. V subapikálnych hyfách bolo pozorované vyliatie cytoplazmy (Obr. 7). Tieto miesta pravdepodobne predstavovali vetviace sa miesta hýf. Počas termálneho stresu je tak HacAp nevyhnutný pre udržanie integrity bunkovej steny a vrcholov hýf. Mutanty *hacAΔ* majú zvýšenú citlivosť voči kaspofungínu, amfotericínu B a azolovým antimykotikám (RICHIE a kol. 2009).



Obr. 7. Strata integrity bunkovej steny u *Aspergillus fumigatus* pri 45 °C. Konídie „divokého“ kmeňa (wt) a kmeňa s deléciou génu *HACA* ($\Delta hacA$) boli inokulované do tekutého AMM (z angl. *Aspergillus* minimal medium) média s glukózou a inkubované pri 37 °C po dobu 24 h. Platne boli potom kultivované na IMO médiu (z angl. inhibitory mold agar) pri teplote 45 °C a hýfy boli fotografované po 4 a 8 h. Čierna mierka zodpovedá 30 μ m (prevzaté z RICHIE a kol. 2009).

Ďalej budú nasledovať príklady húb, ktorých mechanizmus aktivácie UPR pri strese v ER je odlišný od klasickej indukcie UPR popísanej u *S. cerevisiae* a patogénnych húb.

Candida glabrata – v odpovedi na stres v ER stratila kanonickú UPR aktivovanú Ire1p-Hac1p. Ire1p zohráva úlohu nezávisle na Hac1p, nezostriháva mRNA kódujúcu ortológ Hac1p alebo iný TF s motívom leucínového zipsu identifikovaný v jej genóme (MIYAZAKI a kol. 2013). Na základe toho MIYAZAKI a kol. predpokladali prepojenie Ire1p s inou signálnou dráhou *C. glabrata* a vychádzali i zo znalosti odpovede na stres v ER u *S. cerevisiae*, ktorá vyžaduje i Ser/Thr špecifickú fosfatázu kalcineurín a Slt2p-MAPK (mitogénom aktivovaná proteín kináza) (BONILLA a kol. 2002, BONILLA a CUNNINGHAM 2003). Na overenie svojej hypotézy autori pripravili 4 mutantné kmene s deléciou génov kódujúcich kľúčové komponenty tejto signálnej dráhy, vrátane *IRE1*, regulačnej B podjednotky kalcineurínu *CNB1*, kalcineurínom regulovaného TF *CRZ1* a posledného člena PKC1-MAPK kaskády *SLT2*. Pri kvapkových testoch na syntetickom komplexnom médiu bez tryptofánu (SC-trp) s induktormi UPR, tunikamycínom

($c = 1,5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) a dithiothreitolom (12,5 mM), bola preukázaná znížená rezistencia týchto mutantných kmeňov v porovnaní s rodičovským kmeňom. Transkripčná odpoveď *C. glabrata* na stres v ER je teda závislá na Ire1p, na signalizácii kalcineurínom a na dráhe Slt2-MAPK (MIYAZAKI a kol. 2013).

HOOKS a GRIFFITHS-JONES (2011) zistili, že nekanonická štruktúra intrónu Hac1p/Xbp1 nie je konzervovaná u 28 zo 156 študovaných eukaryotických druhov vrátane niekoľkých druhov *Candida sp.*, ako *Candida parapsilosis*, *Candida lusitanae* a *Candida guilliermondii*. Tieto druhy tak pravdepodobne stratili mechanizmus nekonvenčného zostrihu, ale vytvorili si iný, alternatívny mechanizmus regulácie UPR. V súčasnosti u týchto druhov prebiehajú štúdie, či je Hac1p nejakým spôsobom zapojený do odpovede na stres v ER.

Schizosaccharomyces sp. – u tohto rodu kvasiniek nebola objavená žiadna štruktúra podobná génu *HAC1* (HOOKS a GRIFFITHS-JONES 2011). U *S. pombe* vedú rôzne druhy stresu, napr. vysoká osmolarita média, rast za suboptimálnych výživových podmienok, vysoká teplota a oxidatívny stres, ku aktivácii stresom aktivovanej MAPK Spc1p (alias Sty1p). MAPK kináza Wis1p aktivuje Spc1p fosforyláciou. Hladina fosforylácie tyrozínu Spc1p sa zvyšuje pri odpovedi na osmotický stres. Mutanty *scp1Δ* a *wis1Δ* vytvárajú pred mitotickým delením extrémne zväčšené bunky a bunkový cyklus je zastavený, čo poukazuje na vzájomné prepojenie MAPK kaskády Wis1p/Spc1p s kontrolným mechanizmom v G2/S fáze bunkového cyklu (WARBRICK a FANTES 1991, MILLAR a kol. 1995, SHIOZAKI a RUSSEL 1995). Komponenty tejto MAPK kaskády sú homológne komponentom osmosenzitívnej MAPK dráhy HOG1 *S. cerevisiae* a stresom aktivovanej kináze JNK *D. melanogaster* a cicavčej kináze p38 (TOONE a JONES 1998). Keďže kináza JNK i p38 sú aktivované rôznymi typmi stresu a dráha HOG1 je aktivovaná iba pri osmotickom strese, Spc1p je viac podobná kinázam JNK a p38. CHEN a kol. (2003) identifikovali spoločné gény stresovej odpovede, ktoré nazvali ako CESR gény (z angl. core environmental stress response). Gény CESR gény sú regulované Spc1p prostredníctvom transkripčného faktora Atf1p, ktorý je homológny proteínu Atf2p regulovanom proteín kinázou JNK a p38.

S. pombe je prirodzený auxotrof na inozitol, pretože nemá gén kódujúci inozitol-3-fosfát syntázu potrebný pre biosyntézu inozitolu. Absencia inozitolu v kultivačnom médiu je pre túto kvasinku letálna (YARBROUGH a CLARK 1957, MACNEILL 2002).

Kľúčovú úlohu pri translokácii nascentných polypeptidov, správnom zbaľovaní a kontrole kvality novosyntetizovaných proteínov má molekulárny chaperón kalnexín

(BUKAU a kol. 2000, FEWELL a kol. 2001, WILLIAMS 2006). Pri dlhodobom strese v ER indukuje proapoptickú odpoveď (GUÉRIN a kol. 2008).

Pichia pastoris – u tejto metylotrofnej kvasinky GUERFAL a kol. (2010) identifikovali homológ *HAC1* a jeho zostrihové miesta, ale pri kultivácii *P. pastoris* na štandardnom kultivačnom médiu bez induktora stresu v ER neboli schopní dokázať prítomnosť nezostrihnutej formy mRNA *HAC1*. Je pravdepodobné, že u tejto kvasinky je UPR konštitutívne aktivovaná. Po identifikácii sekvencie kódujúcej aktívny Hac1p autori pripravili kmeň s jeho konštitutívnou expresiou a odhalili výrazne zvýšenú expresiu *KAR2*, ktorý patrí medzi responzívne gény UPR. Elektrónovou mikroskopiou bola u tohto kmeňa odhalená expanzia intracelulárnych membrán. Na základe toho môže byť zvýšená expresia *HAC1* u *P. pastoris* využitá vo farmaceutickom priemysle, biomedicíne a v biotechnológiách na zvýšenie produkcie heterológnych proteínov (GUERFAL a kol. 2010).

2.7 Modelový gén pre štúdium UPR u kvasinky *S. cerevisiae*

Pre štúdium stresu v ER som si zvolila C-terminálne značenie génu *SEC61* pomocou GFP. Gén *SEC61* patrí medzi gény, ktoré obsahujú vo svojej promótorovej sekvencii UPRE, a teda je pozitívne regulovaný TF Hac1p pri indukcii stresu v ER (TRAVERS a kol. 2000).

Proteín Sec61p je komponentou proteínového translokačného kanála v membráne drsného ER a jeho asociácia s ďalšími proteínmi determinuje jeho funkciu v kotranslačnom alebo posttranslačnom transporte sekrečného proteínu z cytosolu do lumen ER. Sec61p a dva malé proteíny Sbh1p a Sss1p tvoria heterotrimérny komplex Sec61 tvoriaci kanál pre kotranslačný import proteínu do ER. Posttranslačný transport do ER sprostredkováva heptamérny Sec komplex tvorený Sec61p, Sec63p, Sec62p, Sec71p, Sec72p, Sbh1p a Sss1p (JOHNSON a VAN WAES 1999). Sec61p je súčasťou veľkého komplexu s proteazómom a ubiquitín ligázou Hrd1p, a tak sa Sec61p pravdepodobne podieľa i na retrográdnom transporte proteínov z ER do cytosolu a degradácii nesprávne zbalených proteínov (KALIES a kol. 2005, NG a kol. 2007). Proteín Sec61p je pre bunky esenciálny.

2.8 Regulácia transkripcie génov s intrónom

Ako som už spomínala, kódujúca sekvencia génu *HAC1* je v pozícii 662-913 prerušená nekódujúcou intervenujúcou sekvenciou (COX a WALTER 1996, MORI a kol. 1996).

Intróny sa popisujú predovšetkým v súvislosti s mechanizmom alternatívneho zostrihu, vďaka ktorému organizmy zvyšujú komplexnosť proteómu vznikom rôznych proteínov z jediného génu (NILSEN a GRAVELEY 2010). Veľké množstvo energie potrebnej na udržanie intrónov a prítomnosť zložitej mašínérie proteínov umožňujúcich ich zostrih naznačuje ďalšie zásadné a evolučne konzervované funkcie intrónov v eukaryotických bunkách (MOABBI a kol. 2012).

Genóm *S. cerevisiae* obsahuje celkovo 6575 otvorených čítacích rámcov (5040 je overených; údaj k 8.8.2013 z databázy *Saccharomyces* Genome Database) a 282 z nich obsahuje intervenujúcu sekvenciu (údaj k 8.8.2013 z databázy Ares Lab Yeast Intron Database, verzia 4.3). Keďže iba 4,3 % kvasinkových génov obsahuje intrón, k rozmanitosti proteómu významným spôsobom neprispievajú, a len málo z nich je upravovaných alternatívnym zostrihom (JUNEAU a kol. 2006). Transkripciou génov s intrónom sa však produkuje až 27 % celkovej bunkovej mRNA (ARES a kol. 1999, SPINGOLA a kol. 1999).

Gény obsahujúce intrón môžu byť na základe ich funkcie rozdelené do 10 skupín: cytoskeletárne, gény metabolizmu RNA, segregácie chromozómov a meiózy, metabolizmu, mitochondrií, zbaľovania proteínov a proteínovej degradácie, transkripcie a translácie, gény ER a Golgiho komplexu, ribozomálnych proteínov a zatiaľ necharakterizované gény (podľa databázy MIPS CYGD - Comprehensive Yeast Genome Database, GÜLDENER a kol. 2005).

Prítomnosť intrónu zvyšuje efektivitu génovej expresie (ARES a kol. 1999, LE HIR a kol. 2003, ROSE 2008). U kvasiniek produkujú gény s intrónmi (tzv. i-gény, z angl. intronic genes) priemerne 3,9-krát viac mRNA než gény bez intrónov (tzv. e-gény, z angl. single-exon genes). Rozdiely v transkripcii a translácii i-génov a e-génov môže vysvetľovať fakt, že vysoké percento génov s intrónom je ribozomálnych a tie musia byť exprimované vo vysokých hladinách. Ribozomálna skupina génov zahŕňa gény kódujúce proteíny cytosolických ribozómov (*RPL*, *RPP*, *RPS*), mitochondriálnych ribozómov, proteíny translačnej iniciácie a elongačné faktory. Ribozomálne i-gény produkujú 3,7-krát viac mRNA a 4,1-krát viac proteínov než ribozomálne e-gény. Tieto dáta poukazujú na to, že intróny sú evolučne konzervované u tých génov, ktoré musia byť exprimované vo vysokých hladinách a priamym alebo nepriamym spôsobom zvyšujú úroveň produkcie RNA a proteínov (JUNEAU a kol. 2006).

V cicavčích bunkách je úroveň expresie bezintrónových transgénov 10-100-násobne nižšia než za prítomnosti intrónu v danom géne (LE HIR a kol. 2003). Mnoho cicavčích génov, vrátane génov kódujúcich β -globín, rastový hormón, tymidylát syntázu, fosforylázu

purínových nukleotidov, katepsín L a HIV-1, vyžaduje pre ich normálnu expresiu intrón (prevzaté z MOABBI a kol. 2012).

Intróny pôsobia pozitívne i na fitness *S. cerevisiae*. Delécia intrónov z niekoľkých kvasinkových génov dokáže narušiť ich transkripciu do takej miery, že spôsobí rastové defekty (JUNEAU a kol. 2006, PARENTEAU a kol. 2008).

JUNEAU a kol. (2006) sa zamerali na vplyv delécie intrónu u troch esenciálnych génov: *ACT1* (kóduje aktín), *GLC7* (kóduje Ser/Thr proteínovú fosfatázu) a *PRE3* (kóduje beta 1 podjednotku 20S proteazómu). Delécia intrónu vo všetkých troch génov znížila úroveň expresie ich mRNA a u bezintrónových mutant *act1* a *glc7* vyvolala rastový defekt. Efekt delécie intrónov týchto génov sledovali počas rastu >24 hod. meraním optickej denzity kultúry každých 15 min a v prítomnosti inhibítorov daného proteínu. Znížené množstvo proteínu spôsobené deléciou intrónu malo výraznejší efekt v prítomnosti inhibítora špecifického pre daný proteín. Rodičovský kmeň bol diploidný kmeň *S. cerevisiae* BY4743 (JUNEAU a kol. 2006).

PARENTEAU a kol. (2008) sa pokúsili o prípravu modelového eukaryotického organizmu odvodeného od *S. cerevisiae* s deléciou všetkých intrónov. Intróny deletovali jednak individuálne alebo postupne z toho istého kmeňa. Ich experimenty preukázali, že 1/3 kvasinkových intrónov nie je pre rast esenciálna a iba tri intrónové delécie spôsobili závažné rastové defekty. V porovnaní s JUNEAU a kol. 2006 išlo o gény *MTR2* (kóduje transportný regulátor mRNA, mechanizmus jeho zostrihu je alternatívny), *YRA1* (kóduje jadrový polyadenylačný RNA-väzobný proteín) a *TAD3* (kóduje podjednotku tRNA špecifickej adenosín-34 deaminázy). U každého génu bol efekt delécie jeho intrónu odstránený pri expresii bezintrónovej mRNA z heterológneho promótora. Kombinovaná delécia intrónov všetkých 15 génov asociovaných s cytoskeletom, prekvapivo, nemala žiaden vplyv na rast či fitness príslušného kmeňa. Efekt delécie intrónu na rast merali na bohatom YEPD médiu ($\sim 4 \times 10^6$ buniek/ml) a všetky kmene boli podrobené 21 odlišným fenotypovým testom v tekutom YEPD médiu. Rodičovský kmeň bol diploidný kmeň *S. cerevisiae* 10I odvodený od haploidných kmeňov BY4700 a BY4705 (PARENTEAU a kol. 2008).

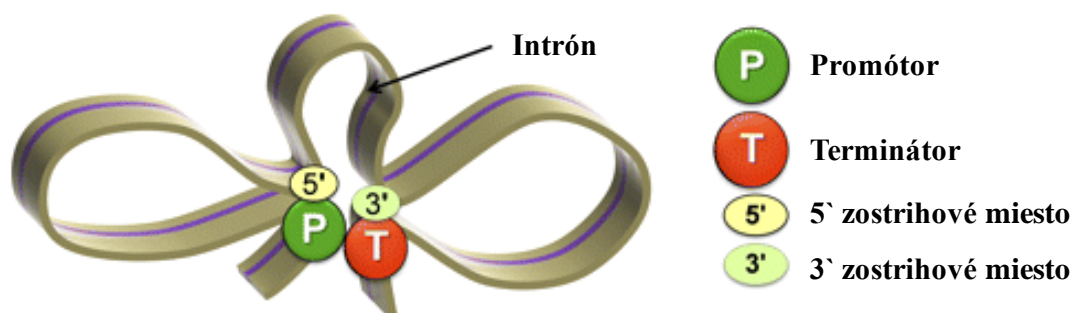
U všetkých organizmov však nájdeme aj gény, ktorých expresia vôbec nezávisí od toho, či intrón majú alebo nie. Minoritná časť génov je intrónom negatívne regulovaná. V niektorých prípadoch intróny zvyšujú množstvo translatovaného produktu bez zvýšenia transkripcie génu – buď majú vplyv na stabilitu mRNA alebo umožňujú transport mRNA z jadra do cytoplazmy (LE HIR a kol. 2003, ROSE 2008).

Regulácia transkripcie sprostredkovaná intrónom môže byť vo všeobecnosti rozdelená do dvoch kategórií: a) regulácia nezávislá na zostrihu a b) regulácia závislá na zostrihu.

Pri regulácii nezávislej na zostrihu intróny často stimulujú transkripciu, pretože súčasťou ich sekvencie môžu byť zosilňovače transkripcie alebo promótorové elementy (ROSE 2008).

Regulácia transkripcie závislá na zostrihu vyžaduje funkčný intrón, ktorý je na zostrih kompetentný, nemá mutácie v konzervovaných sekvenciách na 5' zostrihovom mieste, 3' zostrihovom mieste a vetviacom mieste a nie je inzertovaný v „antisense“ orientácii (FURGER a kol. 2002, CHARRON a kol. 2007). Tento priamy efekt intrónu na transkripciu génov sa označuje ako „intrónom sprostredkované zosilnenie“ (IME, z angl. „intron-mediated enhancement“) a vyžaduje prítomnosť intrónu v blízkosti 5' konca génu. Autori sa v štúdiách domnievajú, že 5' zostrihové miesto v blízkosti promótoru uľahčuje väzbu transkripčnej mašínérie do oblasti promótoru a tak napomáha iniciácii transkripcie (KWEK a kol. 2012). Presný mechanizmus IME nie je ešte úplne jasný (MOABBI a kol. 2012).

MOABBI a kol. (2012) dokázali, že inzercia intrónu do génu *INO1* (kóduje inozitol-3-fosfát syntázu, za normálnych okolností bez intrónu) spôsobí jeho konštitutívnu aktiváciu. Zosilnenie génovej expresie *INO1* je podmienené vytvorením tzv. génovej slučky (z angl. gene loop), kedy v prítomnosti intrónu dochádza ku interakcii promótoru génu *INO1* s oblasťou terminátora. Promótorová oblasť navyše interaguje s 5' zostrihovým miestom a oblasť terminátora s 3' zostrihovým miestom (Obr. 8) (MOABBI a kol. 2012).



Obr. 8. Model génovej slučky. Jej vytvorenie je závislé na intróne, ktorý je kompetentný na zostrih (upravené podľa MOABBI a kol. 2012).

Molekulárny základ vytvorenia génovej slučky je podmienený TFIIB. Vo všeobecnosti je známe, že TFIIB sa pri tvorbe preiniciačného komplexu viaže do promótorovej oblasti génu a interaguje s proteínom viažucim sa na TATA box (TBP, z angl. TATA-box binding protein) a RNA polymerázou II (CHO a BURATOWSKI 1999).

MEDLER a kol. (2011) u *S. cerevisiae* purifikovali komplex TFIIB s faktormi viažucimi sa do oblasti terminátora. Práve táto interakcia pravdepodobne podmieňuje vytvorenie génovej slučky prepojením oblasti promótora a terminátora (ANSARI a HAMPSEY 2005, SINGH a HAMPSEY 2007, EL KADERI a kol. 2009).

Ak je gén v slučkovej konfigurácii, promótor je v blízkosti oblasti terminátora. To po ukončení transkripcie umožní polymeráze okamžite sa viazať do oblasti promótora, reiniciovať transkripciu, čo celkovo vedie k zosilneniu génovej expresie (MOABBI a kol. 2012).

Analogicky sa štruktúra génovej slučky podieľa na transkripčnom zosilnení génu *ASC1* (kóduje beta podjednotku G-proteínu, obsahuje intrón). Delécia intrónu génu *ASC1* znížila hladinu mRNA 25-násobne (MOABBI a kol. 2012).

Pri štúdiu literatúry sa mi nepodarilo nájsť žiadne informácie o zostrihu podobnom *HAC1* u iných génov. Delécia intrónu génu *HAC1* nenaruší jeho funkciu – pri expresii zostrihnutého génu *HAC1* *C. albicans* z expresného vektora *ADHI* u *S. cerevisiae* s deléciou génu *HAC1* neboli pozorované významné fenotypové rozdiely v porovnaní s nemutovaným kmeňom *S. cerevisiae* (WIMALASENA a kol. 2008).

3 Ciele práce

- Popísať funkciu proteínu Hac1p pri vývoji kolónií u *Saccharomyces cerevisiae*.
- Sledovanie vplyvu delécie génu *HAC1* u prírodných kmeňov kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* odlišného pôvodu.
- Príprava kmeňov so zvýšenou expresiou génu *HAC1*.
- Rastová analýza kmeňov za neselektívnych i selektívnych podmienok. Testovanie citlivosti k inhibítorom.
- Detekcia produkcie vybraných proteínov imunodetekciou a pomocou fluorescencie.

4 Materiál a metódy

4.1 Materiál

4.1.1 Použité mikroorganizmy

Saccharomyces cerevisiae **BR-F**:

MAT a/ α , prototrofný prírodný kmeň, získaný zo zbierky Chemického inštitútu Akadémie vied Slovenskej republiky v Bratislave, kat. číslo CCY 21-4-97. Na GM vytvára vrásčité kolónie.

Saccharomyces cerevisiae **BR-F-Flo11p-GFP**:

MAT a/ α , prototrofný, zo zbierky Katedry genetiky a mikrobiológie Prírodovedeckej fakulty UK v Prahe, odvodený od kmeňa BR-F, kmeň vytvorený RNDr. Šťovíčkou, PhD. s produkciou fúzneho proteínu Flo11p-GFP lokalizovaného v bunkovej stene.

Saccharomyces cerevisiae **BR-S**:

MAT a/ α , prototrofný, zo zbierky Katedry genetiky a mikrobiológie Prírodovedeckej fakulty UK v Prahe, odvodený od kmeňa BR-F jeho domestikáciou za laboratórnych podmienok a kultiváciou na bohatom agarovom médiu. Na GM vytvára hladké kolónie podobné kolóniám laboratórnych kmeňov (KUTHAN a kol. 2003).

Saccharomyces cerevisiae **PORT**:

MAT a/ α , monokoloniálny izolát prírodného vinárskeho kmeňa, ktorý sme odvodili od kmeňa WY63 získaného od Dorit Schuller z Universidade do Minho, Braga (Portugalsko). Na GM vytvára hladké až polovrásčité kolónie, po pridaní 0,05 mM Se do GM vytvára vrásčité kolónie.

Saccharomyces cerevisiae **PORT-Sec61p-GFP**:

MAT a/ α , prototrofný, odvodený od kmeňa PORT, kmeň vytvorený v našom laboratóriu RNDr. Schierovou, Ph.D. s produkciou fúzneho proteínu Sec61-GFP lokalizovaného v membráne drsného ER.

Saccharomyces cerevisiae **BY4742**:

MAT α , his3, ura3, leu2, lys2, laboratórny haploidný kmeň získaný zo zbierky Euroscarf, na GM tvorí hladké kolónie.

Saccharomyces cerevisiae **Σ S^h**:

MAT α , laboratórny haploidný kmeň odvodený od diploidného kmeňa Σ 1278, na GM tvorí vrásčité kolónie.

***Escherichia coli* DH5 α :**

F⁻, recA1, endA1, gyrA96, thi⁻, supE44, relA1, hsdR17 (r_k⁻, m_k), α ⁻, Δ (argF-lacZya), U169, Φ 80 lac ZM15.

4.1.2 Zoznam pripravených kvasinkových kmeňov

Zoznam pripravených kmeňov použitých pre účely tejto práce sú zhrnuté v tab. 1.

Názov kmeňa	Genotyp	Autor *
PORT-<i>hac1</i>	PORT, <i>MATa/MATa hac1Δ::kanMX / hac1Δ::nat1</i>	MS
PORT-P_{TEF}-<i>HAC1</i>	PORT, <i>MATa/MATa P_{TEF}-HAC1-kanMX / HAC1</i>	JR
PORT-Sec61p-GFP	PORT, <i>MATa/MATa SEC61-EGFP-kanMX / SEC61</i>	MS
PORT-<i>hac1</i>/ Sec61p-GFP	PORT, <i>MATa/MATa hac1Δ::nat1 / hac1Δ, SEC61-EGFP-kanMX / SEC61</i>	JR
PORT-P_{TEF}-<i>HAC1</i>/ Sec61p-GFP	PORT, <i>MATa/MATa P_{TEF}-HAC1-nat1 / HAC1, SEC61-EGFP-kanMX / SEC61</i>	JR
BR-F-Flo11p-GFP	BR-F, <i>MATa/MATa FLO11-EGFP / FLO11</i>	VŠ
BR-F-<i>hac1</i>/ Flo11p-GFP	BR-F, <i>MATa/MATa hac1Δ::kanMX / hac1Δ::nat1, FLO11-EGFP / FLO11</i>	MS, JR
BR-F-<i>hac1</i>	BR-F, <i>MATa/MATa hac1Δ::kanMX / hac1Δ::nat1</i>	MS
BR-F-P_{TEF}-<i>HAC1</i>/ Flo11p-GFP	BR-F, <i>MATa/MATa P_{TEF}-HAC1-kanMX / HAC1, FLO11-EGFP / FLO11</i>	JR
BY4742-<i>hac1</i>	BY4742, <i>MATa, his3, ura3, leu2, lys2, hac1Δ::nat1</i>	JR
ΣS^h-<i>hac1</i>	Σ S ^h , <i>MATa, hac1Δ::nat1</i>	JR
BR-S-P_{TEF}-<i>HAC1</i>	BR-S, <i>MATa/MATa P_{TEF}-HAC1-kanMX / HAC1</i>	JR

Tab. 1. Zoznam kmeňov použitých v diplomovej práci. * JR = Jana Rušinová, MS = RNDr. Michaela Schierová, Ph.D., VŠ = RNDr. Vratislav Šťoviček, Ph.D.

4.1.3 Vektory

Použité vektory slúžili ako PCR templát pre následnú transformáciu kvasinkových buniek:

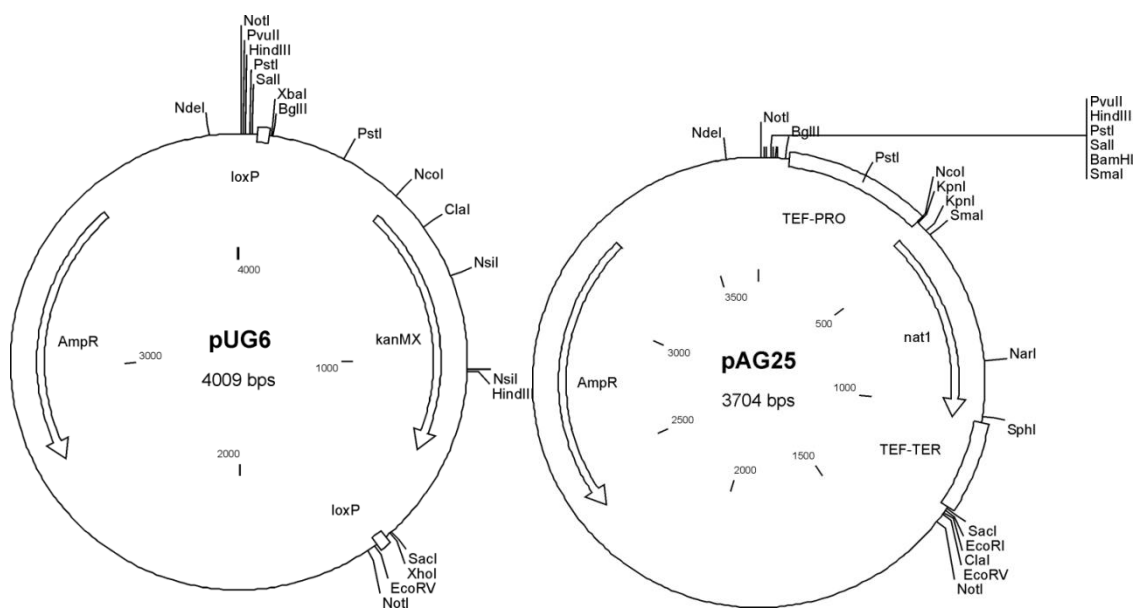
- delečnou PCR kazetou na deléciu zvoleného génu (plazmidy pUG6 a pAG25),
- PCR kazetou nesúcou promótor TEF zabezpečujúci konštitutívnu expresiu zvoleného génu (plazmidy pYM-N18 a pYM-N20),
- PCR kazetou zabezpečujúcou fluorescenčné značenie C-konca zvoleného proteínu (vytvorenie fúzneho proteínu s fluorescenčným proteínom GFP – plazmid pKT127).

Plazmid pSH65 bol využitý na odstránenie selekčného markera *kanMX* pomocou *creA* rekombinázy u delečných kmeňov transformovaných plazmidom pUG6, pokiaľ prítomnosť tohto markera bránila ďalším manipuláciám so zvoleným kmeňom.

Selekčným markrom pre bunky *E. coli* bola vo všetkých prípadoch ampicilínová rezistencia Amp^R. Zoznam použitých plazmidov a ich charakteristika je v tab. 2, fyzikálne mapy plazmidov znázorňujú obr. 9, 10 a 11. Plazmidy boli získané zo zbierky Euroscarf.

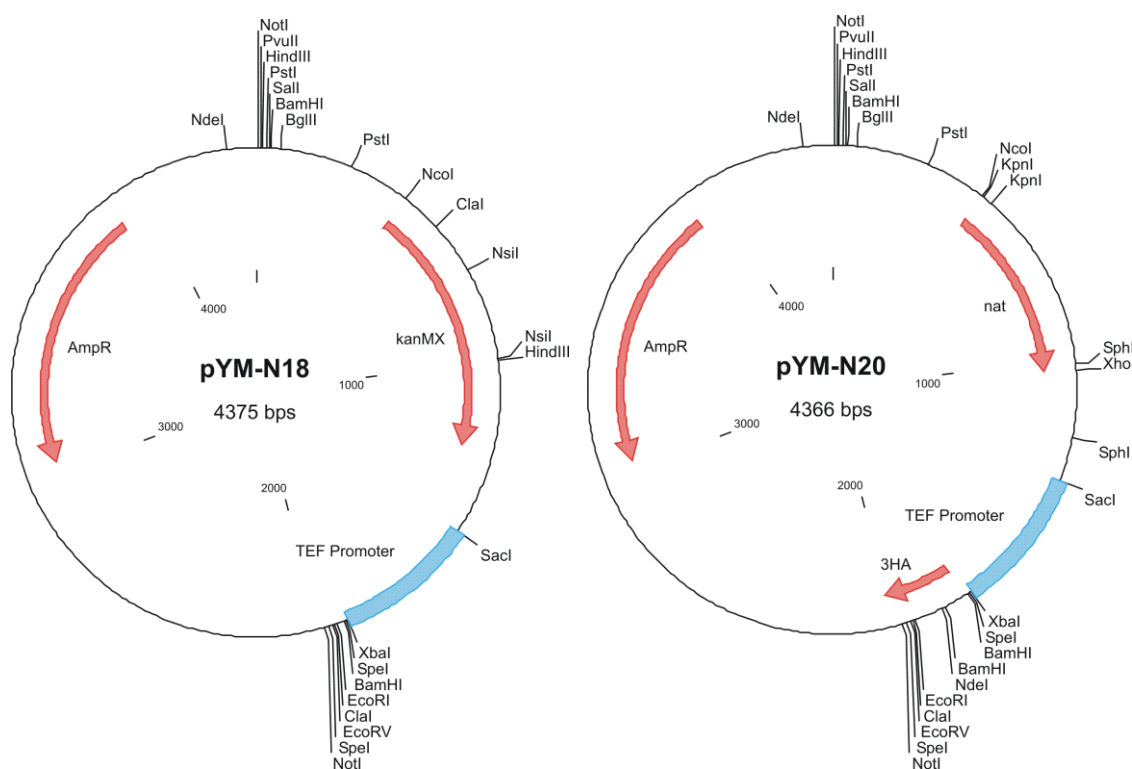
Plazmid	Charakteristika
pUG6	4009 bp, Amp ^R , ori, loxP-kanMX-loxP génová delečná kazeta plazmid odvodený od pFA6-kanMX4, obsahuje gén <i>kanMX</i> , ktorý dáva transformovaným bunkám rezistenciu voči aminoglykozidovému antibiotiku geneticín (G418); príslahlé loxP miesta umožňujú odstránenie delečného markera expresiou creA rekombinázy (GÜLDENER a kol. 1996) (Obr. 9)
pAG25	3704 bp, Amp ^R , ori, génová delečná kazeta plazmid odvodený od pFA6-natMX4, obsahuje gén <i>NAT1</i> zo <i>Streptomyces noursei</i> kódujúci nourseothricín N-acetyl-transferázu; transformovaným bunkám dáva rezistenciu voči antibiotiku nourseothricín (NAT) (GOLDSTEIN a McCUSKER 1999) (Obr. 9)
pYM-N18	4375 bp, Amp ^R , ori plazmid odvodený od pFA6-kanMX4, obsahuje gén <i>kanMX</i> , ktorý dáva transformovaným bunkám rezistenciu voči aminoglykozidovému antibiotiku geneticín (G418); kazeta odvodená z plazmidu sa používa pri výmene promótoru, pričom sa prirodzený promótor nahradí silným, konštitutívnym promótorom TEF (JANKE a kol. 2004) (Obr. 10)
pYM-N20	4366 bp, Amp ^R , ori plazmid obsahuje gén <i>NAT1</i> zo <i>Streptomyces noursei</i> kódujúci nourseothricín N-acetyl-transferázu; transformovaným bunkám dáva rezistenciu voči antibiotiku nourseothricín (NAT); kazeta odvodená z plazmidu sa používa pri výmene promótoru, pričom sa prirodzený promótor nahradí silným, konštitutívnym promótorom TEF (JANKE a kol. 2004) (Obr. 10)
pSH65	8138 bp, Amp ^R , ori, GAL1-cre, Ble ^R , delta-ura3 rekombinačný expresný vektor, obsahuje gén pre creA rekombinázu pod kontrolou promotora GAL; pomocou creA rekombinázy sa z príslušného kmeňa odstráni marker ohraničený loxP miestami; markrom pre selekciu v <i>S. cerevisiae</i> je phleomycín (GUELDERER a kol. 2002) (Obr. 11)
pKT127	4894 bp, Amp ^R , ori plazmid obsahuje ako selekčný marker gén <i>kanMX</i> , ktorý dáva transformovaným bunkám rezistenciu voči aminoglykozidovému antibiotiku geneticín (G418); plazmid sa využíva na konštrukciu PCR fragmentu, ktorý slúži na C-terminálnu GFP fúziu zvoleného génu (SHEFF a THORN 2004) (Obr. 11)

Tab. 2. Charakteristika plazmidov využitých pre konštrukciu kmeňov *S. cerevisiae* použitých v tejto práci.



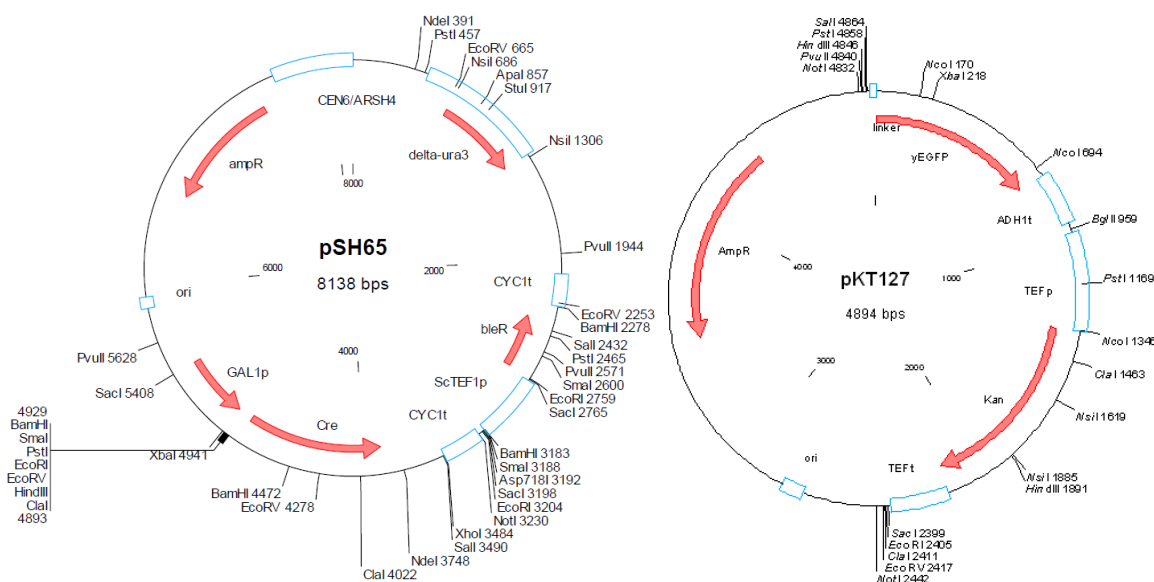
Obr. 9. Schéma plazmidov pUG6 a pAG25 použitých na prípravu delečnej kazety príslušného génu s vyznačenými miestami pre restrikčné endonukleázy.

Prevzaté z: <http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/data/pUG6.gif>
<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/data/pAG25.gif>



Obr. 10. Schéma plazmidov pYM-N18 a pYM-N20 určených na prípravu PCR fragmentov zaistujúcich konštitutívnu expresiu príslušného génu s vyznačenými miestami pre restričné endonukleázy.

Prevzaté z : <http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/data/pYM-N18.gif>
<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/data/pYM-N20.gif>



Obr. 11. Schéma plazmidov pSH65 obsahujúceho creA rekombinázu a pKT127 určeného na konštrukciu PCR fragmentu, ktorý slúži na C-terminálnu GFP fúziu zvoleného génu s vyznačenými miestami pre restričné endonukleázy.

Prevzaté z : <http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/data/P30122.pdf>
<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/data/pKT127.gif>

4.1.4 Primery

Pri navrhovaní primerov sa vychádzalo zo sekvencie príslušného génu plus 1000 bp v „upstream“ oblasti a 1000 bp v „downstream“ oblasti (DNA + 1kb „up“/„downstream“). Táto sekvencia bola vložená do počítačového programu Clone a snahou bolo navrhnúť primery tak, aby v minimálnom počte tvorili sekundárne vlásenkové štruktúry, mali približne rovnakú teplotu pripojenia, obsah GC párov bol v rozmedzí 40-60 % a rozmiestnenie nukleotidov bolo rovnomerné. Nemali by vznikáť primer diméry, ktoré znižujú účinnosť PCR reakcie. Sekvencia primerov musela byť unikátna, primery tak nasadali iba na špecifické miesto templátovej DNA a nie na iné príbuzné sekvencie.

V tab. 3, 4, 5 sú uvedené všetky použité primery. Pri PCR reakciách bola používaná 1/10 objemu 5 µM primerov. Primery boli objednávané od firmy Sigma alebo Invitrogen.

<i>HACI</i> - dĺžka sekvencie 2969 bp (DNA + 1kb up/downstream)			
primery použité na prípravu delečnej kazety:			
Názov	Poloha	Dĺžka	Sekvencia 5'→3'
<i>HACI</i> F DEL	1028	64 bp	AGTAATTCGCAATCGAACTTGGCTATCCCTACCAACTTCA AGTCGcagctgaagcttcgtacgc
<i>HACI</i> R DEL	2098 C	67 bp	AAGTAGCACACACTAACCGGAGACAGAACAGTAGAAAC CACTAAGgcatagggcactagtggatctg
primery pre inzerciu promotora TEF:			
Názov	Poloha	Dĺžka	Sekvencia 5'→3'
<i>HACI</i> TEF F	959	63 bp	TAACAACCTCCTCCTCCCCACCTACGACAACAACCGCC ACTATGgctacgctgcaggtcgac
<i>HACI</i> TEF R	1058 C	75 bp	TAGGGATAGCCAAGTTCGATTGCGAATTACTAGTTAGTT CAAAATCAGTCATTTTcctcgatgaattctctgtcg
diagnostické primery:			
Názov	Poloha	Dĺžka	Sekvencia 5'→3'
<i>HACI</i> A	376	20 bp	CAGGCCTTCCAGGAGTGGTT
<i>HACI</i> B	1532 C	20 bp	CAGGTAGCGTCGTCGACTCT
<i>HACI</i> C	1414	20 bp	TACAATGGAGCCTGCGACTT
<i>HACI</i> D	2578 C	20 bp	GCGGAACAGAACATTCTTGG

Tab. 3. Primery použité na prípravu delečnej kazety pre gén *HACI* (T_m pre PCR = 54 °C), primery pre inzerciu promotora TEF pred kódujúcu sekvenciu génu *HACI* (T_m pre PCR = 54 °C) a diagnostické primery (T_m pre PCR = 54 °C). U kmeňov *HACI*-TEF je počiatok translácie v bode 1001.

veľké písmená – oblasť homológa so sekvenciou génu *HACI*, resp. so sekvenciou v + 1kb „up“/„downstream“ oblasti génu; malé písmená – oblasť homológa k plazmidu; C – komplementárne vlákno

<i>SEC61</i> - dĺžka sekvencie 3443 bp (DNA + 1kb up/downstream)			
primery použité na prípravu kazety pre 3'-koncovú fúziu génu <i>SEC61</i> s GFP :			
Názov	Poloha	Dĺžka	Sekvencia 5'→3'
<i>SEC61</i> GFP F	2396	63 bp	GGTGGGTTTACTAAGAACCTCGTTCCAGGATT TTCTGATTTGATGggtgacggtgctggttta
<i>SEC61</i> GFP R	2523 C	63 bp	GTAACAAAATAAAAAAATAGAGGGGAGGGGTG TGGCTAAATGCGATtcgatgaattcgagctcg
diagnostické primery:			
Názov	Poloha	Dĺžka	Sekvencia 5'→3'
<i>SEC61</i> C	1618	20 bp	TCGTGGTAAGGAGTTCTGAAG
<i>SEC61</i> D	2952 C	20 bp	CGACCGCGACTACTAAGAAT

Tab. 4. Primery použité na prípravu kazety pre 3'-koncovú fúziu génu *SEC61* s GFP (T_m pre PCR = 54 °C) a diagnostické primery (T_m pre PCR = 60 °C).

veľké písmená – oblasť homológna so sekvenciou génu *SEC61*, resp. so sekvenciou v + 1kb „up“, „downstream“ oblasti génu; malé písmená – oblasť homológna k plazmidu; C – komplementárne vlákno

Ostatné diagnostické primery:			
Názov	Použitie	Dĺžka	Sekvencia 5'→3'
kanMX for	overenie inzercie promotora TEF	20 bp	GATACCAGGATCTTGCCATC
kanMX rev	overenie delécie	20 bp	CTGATTGCCCCGACATTATCG
NAT1 rev	overenie delécie, overenie inzercie promotora TEF	20 bp	GAGTACGAGATGACCACGAA
yEGFP rev	overenie GFP fúzie	21 bp	CGGAGACAGAAAATTTGTGAC

Tab. 5. Zoznam ostatných diagnostických primerov použitých pre overenie kmeňov s deléciou, zvýšenou expresiou príslušného génu a fluorescenčne značených kmeňov.

veľké písmená – oblasť homológna so sekvenciou génu

4.1.5 Chemikálie a enzýmy

Názov	Skratka	Výrobca / Dodávateľ
2-deoxy-D-glukóza	2-DG	Sigma
6x DNA Loading Dye		MBI Fermentas
10 mM dNTP		Top-Bio
Agar		Dr. Kulich Pharma
Agaróza, For Routine Use (DNase and RNase free)		Sigma
Akrylamid		MP Biomedicals
Baktotryptón		Imuna
Bradfordovo činidlo		Bio-Rad
Brómfenolová modrá	BFM	Bio-Rad
Calcofluor White Stain	CFW	Fluka Analytical

Congo Red	CR	Sigma
Coomassie Brilliant Blue R 250	CBB	Serva
D-galaktóza		Lachema
D-glukóza		Bio-Rad
dH ₂ O (PCR)		TaKaRa
Dimetyl sulfoxid (na rozpustenie PIC)	DMSO	Serva
Dimetyl sulfoxid (pre PCR)	DMSO	Top-Bio
DL-Dithiothreitol	DTT	Sigma
Dodecylsulfát sodný	SDS	Sigma
Dusičnan strieborný	AgNO ₃	Lachema
Emerald Amp GT PCR Master Mix		TaKaRa
Emerald Amp Max PCR Master Mix		TaKaRa
Etanol 96% (v/v)	EtOH	Penta, Lach-Ner
Ethidiumbromid	EtBr	Serva
Etyléndiamíntetraacetát	EDTA	Serva
Fenol		Sigma
Fenylmetánsulfonyl fluorid	PMSF	Fluka
Formaldehyd	CH ₂ O, HCHO	Lach-Ner
Glycín	C ₂ H ₅ NO ₂	Serva
Glycerol bezvodý	C ₃ H ₈ O ₃	Lach-Ner
Glutaraldehyd	CH ₂ (CH ₂ CHO) ₂	Sigma
Hovädzí sérový albumín	BSA	Invitrogen TM
Hydrogénfosforečnan disodný dodekahydrát	Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O	Penta
Hydroxid draselný	KOH	Lachema
Hydroxid sodný	NaOH	Lachema, Lach-Ner
Chlorid draselný	KCl	PENTA
Chlorid horečnatý hexahydrát	MgCl ₂ .6H ₂ O	Lachema
Chlorid sodný	NaCl	Lach-Ner
Chloroform	CHCl ₃	Lachema
Igepal CA 630 [Nonidet P 40]	NP40	Fluka
Inhibítor proteáz Mix FY	PIC	Serva
Izoamylalkohol	C ₅ H ₁₂ O	Lachema
Izopropanol	C ₃ H ₈ O	Penta, Lachema
Kazeín z hovädzieho mlieka		Sigma

Kvasničný autolyzát (šarža 83)		IMUNA PHARM
Kvasničný autolyzát (pre bakteriológiu)		Imuna
Kyselina boritá	H_3BO_3	Lachema
Kyselina chlorovodíková (35%)	HCl	Penta
Kyselina octová	CH_3COOH	Penta
Kyselina o-fosforečná (85%)	H_3PO_4	Lachema
Kyselina peroctová (35%) Persteril [®] 36	$C_2H_4O_3$	OVERLACK
LA DNA polymerázový mix	LA DNA Pol Mix	Top-Bio
LA pufor		Top-Bio
Merkaptoetanol		Sigma-Aldrich
Metanol	CH_3OH	Merck KGaA
N, N' - metylén-bis-akrylamid		Serva
N, N, N', N' - tetrametyletyldiamín	TEMED	Serva
Octan amónny	CH_3COONH_4	Lachema
Octan lítny	CH_3COOLi (LiAc)	Serva
Octan draselný	CH_3COOK (KAc)	Lachema
Octan sodný bezvodý	CH_3COONa (NaAc)	Fluka, Sigma
Pefabloc [®] SC (4-(2-aminoetyl) benzénsulfonyl fluorid hydrochlorid	AEBSF	Fluka
Peptón (pre bakteriológiu)		IMUNA PHARM
Persíran amónny		Serva
Polyetylén glykol	PEG	Serva, Sigma
PCR 2' - deoxynukleozid-5' -trifosfátová zmes	PCR dNTP mix	Top-Bio
PCR H_2O		Top-Bio
PPP PCR Master Mix		Top-Bio
Ribonukleáza A	RNáza A	Sigma
Salmon sperm DNA	ssDNA	BioLabs
Síran horečnatý heptahydrát	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	HiChem
Síran kademnatý oktahydrát	$3CdSO_4 \cdot 8H_2O$	Lachema
Síran meďnatý pentahydrát	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	Lachema
Selenát sodný	Na_2SeO_4	Sigma
Tetrationát draselný	$K_2S_4O_6$	Sigma-Aldrich
Tiosíran sodný	$Na_2S_2O_3$	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymetyl)aminometán	Tris	Sigma, Serva

Tryptón		Imuna
Tween® 20		Sigma
Uhličitan draselný	K ₂ CO ₃	Sigma-Aldrich
Zymolyáza		MP Biomedicals
Živný bujón č. 2		Imuna

4.1.6 Komerčné roztoky

Detekčné substráty určené na imunodetekciu:

SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific)

SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific)

4.1.7 Médiá pre kultiváciu kvasiniek

Pozn: Uvedené médiá boli pripravované v destilovanej vode. Destilovaná H₂O bola vyrobená v aparátúre Ultrapur (Watrex). 30% glycerol, 10% kvasničný autolyzát a 20% glukóza boli sterilizované samostatne.

Pevné kultivačné médiá

- **GM**

- 3% (v/v) glycerol
- 1% (w/v) kvasničný autolyzát (šarža 83)
- 2% (w/v) agar

- **GM + 0,05 mM Se**

ako GM médium, po sterilizácii pridať 1/4000 objemu 0,2 M Na₂ SeO₄

- **GM s antibiotikom**

ako GM, po sterilizácii pridať potrebné množstvo antibiotika, štandardne:

- 0,02% (w/v) G418 (geneticín)
- 0,01% (w/v) NAT (nourseothricín)
- 0,003% (w/v) Phle (phleomycín), do média použitý 1 % (w/v) kvasničný autolyzát s pH = 6,8
- 0,002% (w/v) edicín

Médium s edicínom je toxické pre baktérie, bolo využívané pri prenášaní kmeňa z/do kvasinkovej konzervy a pri prečistení kvasinkového kmeňa od príp. bakteriálnej kontaminácie.

- **YD**
 - 2% (w/v) glukóza
 - 1% (w/v) kvasničný autolyzát (šarža 83)
 - 2% (w/v) agar

Tekuté kultivačné média

- **GM**
 - 3% (v/v) glycerol
 - 1% (w/v) kvasničný autolyzát (šarža 83)
- **YD**
 - 2% (w/v) glukóza
 - 1% (w/v) kvasničný autolyzát (šarža 83)

Kvasinkové konzervy

- skladovacie médium
 - 60% (v/v) glycerol
 - 10% (w/v) glukóza
 - 2% (w/v) peptón
 - 1% (w/v) kvasničný autolyzát (šarža 83)

4.1.8 Antibiotiká

Ampicilín (Amp) (Duchefa)

Edicín (Edi) (SANDOZ)

Geneticín (G418) (MP Biochemicals)

Nourseothricín (NAT) (WERNER BioAgents)

Phleomycín (Phle) (InvivoGen)

4.1.9 Ostatné

Membrána s pórmí Nucleopore Membrane Circles, \varnothing membrány 47 mm, \varnothing pórov 5,0 μm (Nucleopore[®])

Sklenené guľičky 425-600 μm

Vyvíjanie filmov:

Fotografické filmy (FOMEI a.s.)

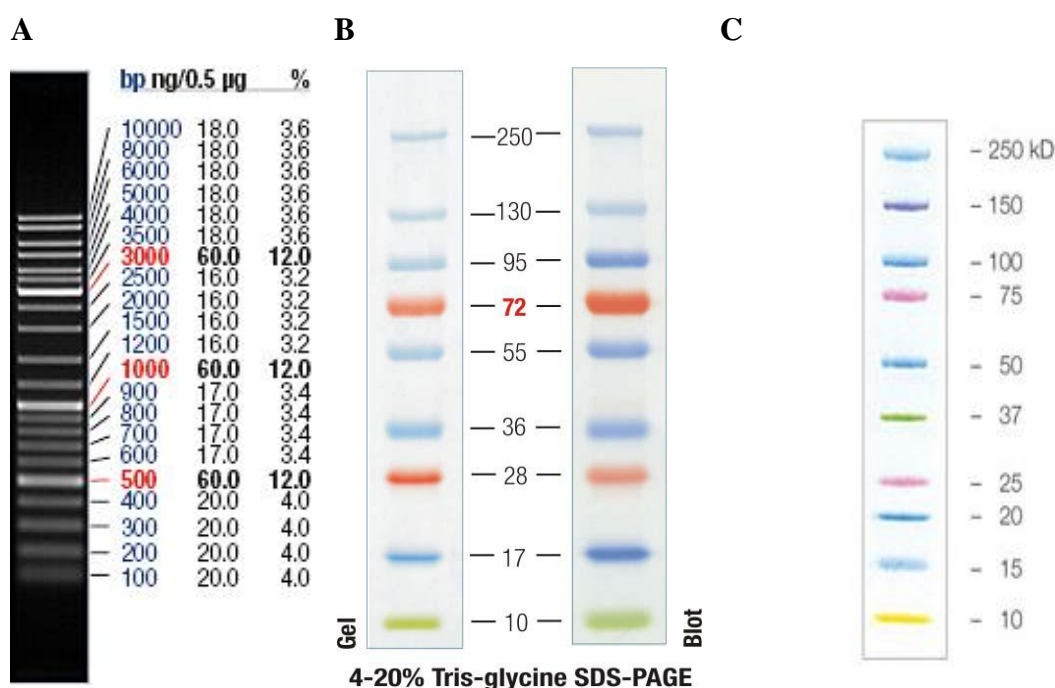
Práškový RTG rýchlostuľovač – zložky A, B, C – pripravené podľa pokynov výrobcu

Vyvíjacie kazety (Cawo ABS cassette)

Vývojka Röntgen Rapid Entwickler (Adefo-chemie GmbH) – zložky A, B - pripravené podľa pokynov výrobcu

4.1.10 Štandardy molekulových hmotností

Štandardy molekulových hmotností pre DNA elektroforézu a proteíny sú uvedené na obr. 12.



Obr. 12. Štandardy molekulových hmotností. A) štandard nukleových kyselín GeneRuler™ DNA ladder (MBI Fermentas), B) proteínový štandard PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder určený na SDS-PAGE a následnú imunodetekciu (MBI Fermentas), C) proteínový štandard Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards #161-0375EDU určený na SDS-PAGE a následné farbenie striebrom (MBI Fermentas). Prevzaté z www.fermentas.com

4.1.11 Počítačové programy a internetové databázy

tvorba primerov:

softvér Clone

programy pre prácu s DNA sekvenciami:

NCBI Blast

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

softvér pre analýzu obrazu:

Image J (SCHNEIDER a kol. 2012)

Colony Counter (SCHIER a KOVÁŘ 2013)

softvér pre analýzu sekvencie DNA:

Sequence Scanner v 1.0

databázy:

<i>Saccharomyces</i> Genome Database (SGD)	http://www.yeastgenome.org/
Pubmed Medline	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Yeasttrack	http://www.yeasttrack.com
YeTFaSCo	http://yetfasco.ccbr.utoronto.ca/

4.2 Metódy

4.2.1 Sterilizácia

Roztoky, média, špáradlá, špičky k mikropipetám a mikroskúmvky boli sterilizované v autokláve 20 min pri tlaku 120 kPa. Plastové centrifugačné skúmavky o objeme 15 ml a 50 ml a kyvety určené na elektroporáciu boli sterilizované minimálne 24 hodín parami kyseliny peroctovej v uzavretom igelitovom vrecúšku. Chemické sklo bolo sterilizované suchým teplom pri teplote 180 °C, predmety ako sklenené mikrobiologické kľučky namočením v etanole a následným žihaním v plameni.

4.2.2 Práca s baktériami

Bakteriálne kultúry boli používané na izoláciu plazmidovej DNA, ktorá bola následne využitá na prípravu PCR kaziet na transformáciu kvasiniek (príp. priamo na transformáciu – pSH65).

4.2.2.1 Izolácia plazmidovej DNA z baktérií (*maxipreparácia*)

- **ŽBAmp**
2,5% (w/v) živný bujón č. 2
50-100 µg.ml⁻¹ ampicilín
- **roztok I**
50 mM glukóza
25 mM Tris (pH = 8)
10 mM EDTA
- **roztok II**
0,2 M NaOH
1% SDS (pridať nakoniec)
0,3 M NaAc (pH = 5,2)

- **roztok III**

5 M KAc
11,5 % (v/v) kyselina octová

- **príprava 1 ml RNázy**

10 mg RNáza A
10 mM Tris (pH = 7,5)
15 mM NaCl
15 min povariť, skladovať pri -20 °C

- **TE 10×**

0,1 M Tris-HCl (pH = 7,4)
0,01 M EDTA-KOH (pH = 8)

- **upravený fenol**

fenol bol niekoľkokrát pretrepaný s 1 M Tris-HCl (pH = 8) a raz s 0,1 M Tris-HCl (pH = 8), pH bolo upravené na 7, fenol bol následne uchovávaný pri teplote -20 °C

- **upravený chloroform**

chloroform zmiešaný s izoamylalkoholom v pomere 24:1

Cez noc sa baktérie nesúce príslušný plazmid nechali narásť v ŽBamp pri teplote 37 °C v objeme 50 alebo 200 ml. Ráno bola bakteriálna kultúra scentrifugovaná pri 3280×g, 10 min, 4 °C (centrifúga Hettich Universal 320 R, Hettich Zentrifugen), pelet bol resuspendovaný v 10 ml roztoku I (pri objeme média 200 ml) a následne bolo pridaných 20 ml roztoku II. Obsah bol premiešaný otáčaním skúmavky a inkubovaný 5 min pri laboratórnej teplote. Do vzorky bolo pridaných 15 ml roztoku III (4 °C), vzorka bola opäť premiešaná otáčaním skúmavky a inkubovaná 15-30 min v ľadovom kúpeľi. Vzorka bola centrifugovaná pri 3850×g, 30 min (centrifúga Hettich Universal 320 R, Hettich Zentrifugen). Supernatant bol prefiltrovaný cez 5-6-krát preloženú gázu a pridal sa 0,8-násobok objemu izopropanolu. Po premiešaní (Vortex Genie 2, Scientific Industries) bola vzorka centrifugovaná pri 3850×g, 30 min, 4 °C (centrifúga Hettich Universal 320 R, Hettich Zentrifugen) a sediment bol premytý 80% etanolom. Po premiešaní (Vortex Genie 2,

Scientific Industries) bola vzorka centrifugovaná pri 3850×g, 10 min, 4 °C (centrifúga Hettich Universal 320 R, Hettich Zentrifugen), sušená 7-10 min a resuspendovaná v 300 µl TE pufri. Kvalitu DNA bolo možné skontrolovať elektroforeticky. Ku vzorke s DNA bola pridaná 1/100 objemu RNázy A a následne bola inkubovaná 0,5-1 hod. pri laboratórnej teplote. Roztok DNA bol prečistený fenol-chloroformovou extrakciou.

K roztoku DNA bol pridaný rovnaký objem upraveného fenolu, 5 min bol premiešavaný otáčaním skúmavky a zmes bola následne centrifugovaná pri 18600×g, 10 min (centrifúga Hettich Mikro 200 Centrifuge, Hettich Zentrifugen). K odobranej vodnej fáze bol pridaný upravený chloroform a roztok sa opäť centrifugoval. Tento krok bolo možné opakovať, dokiaľ úplne nezmizla biela medzifáza vyzrážaných proteínov. K odobranej vodnej fáze bol pridaný 2,5-násobok objemu 98% etanolu a 1/10 objemu NaAc. Zmes bola premiešaná otáčaním, inkubovaná pri -20 °C cez noc alebo 2 hod a centrifugovaná pri 18500×g, 10-30 min, 4 °C (centrifúga Hettich Universal 320 R, Hettich Zentrifugen). Pelet bol opláchnutý 80% etanolom, vysušený a resuspendovaný v TE pufri (asi 50-300 µl).

4.2.2.2 *Príprava kompetentných buniek E.coli*

- **TPN**

1% (w/v)	tryptón
1% (w/v)	peptón
0,5% (w/v)	kvasničný autolyzát
0,5% (w/v)	NaCl

Kompetentné bunky sa vyznačujú schopnosťou prijať cudzorodú DNA na základe ich kultivácie v podmienkach, ktoré zaistia priepustnosť bunkovej steny.

Kultúra *E. coli* DH5α bola zaočkovaná do 25 ml TPN a inkubovaná cez noc v teplovzdušnej trepačke (ProBlot 12S, Labnet; Kühner, Lab-Therm) pri teplote 37 °C. Ráno bola odmeraná OD₆₀₀ (OD – optická denzita) inokula spektrofotometrom (Novaspec Plus, Amersham Biosciences) a to bolo nariadené tak, aby OD₆₀₀ výslednej bunkovej kultúry s 500 ml TPN bola 0,125-0,25. TPN so zaočkovanými bunkami *E. coli* bol rozdelený do piatich 0,5 l bánk po 100 ml. Kultúry boli kultivované pri 37 °C na OD₆₀₀ = 0,5-1,0 (asi 3 hod., počiatok až stred exponenciálnej fázy rastu; trepačky ProBlot 12S, Labnet; Kühner, Lab-Therm). Kultúry boli premiestnené na ľad, centrifugované pri 2500×g, 10 min, 4 °C (centrifúga Hettich Universal 320 R, Hettich Zentrifugen). Pelet bol 2-krát premytý ľadovou demi H₂O (cca 50 ml) a centrifugovaný pri 2500×g, 10 min, 4 °C (centrifúga Hettich

Universal 320 R, Hettich Zentrifugen). Po zliatí demi H₂O bol do každej skúmavky s peletom pridaný 1 ml 10% (v/v) glycerolu (4 °C). Po rozsuspendovaní boli pelety zlúčené do jednej skúmavky a centrifugované pri 2500×g, 10 min, 4 °C (centrifúga Hettich Universal 320 R, Hettich Zentrifugen). Takto premyté bunky boli na ľade rozsuspendované v 0,5–2 ml 10% (v/v) glycerolu (4 °C). Suspenzia buniek bola následne na ľade rozdelená po 50 µl do mikroskúmaviek a zmrazená v tekutom dusíku. Kompetentné bunky boli skladované pri teplote -80 °C.

4.2.2.3 Transformácia baktérií elektroporáciou

- **SOC**

2% (w/v)	baktotryptón
0,5% (w/v)	kvasničný autolyzát
20 mM	glukóza
10 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
10 mM	MgCl ₂ (pridať po sterilizácii)
10 mM	MgSO ₄ (pridať po sterilizácii)

K 50 µl kompetentných buniek *E. coli* DH5α bol pridaný 1 µl plazmidovej DNA. Zmes bola premiešaná a inkubovaná 1 min na ľade. Následne bolo 40 µl buniek vystavených pulzu elektrického prúdu v sterilnej predchladenej elektroporačnej kyvete v elektroporátore (generátor vysokého napätia „Gene Pulser Apparatus“, Bio-Rad) - 2,5 kV pri kapacitancii 25 µF, odpore 200 Ω, po dobu cca 5 ms. Do kyvety bol po pulze pridaný 1 ml SOC média a zmes bola prevedená do 15 ml sterilnej skúmavky. Bunky boli kultivované 1 hod. v teplovzdušnej trepačke (ProBlot 12S, Labnet) pri teplote 37 °C. Transformované bunky boli vo vhodnom riedení vysiate na Petriho misky s príslušným selekčným médiom a kultivované v termostate cez noc pri teplote 37 °C.

4.2.3 Práca s kvasinkovými kultúrami

4.2.3.1 Kultivácia kvasinkových kmeňov

Pri začatí práce s príslušným kmeňom bolo malé množstvo biomasy zo skladovacieho média sterilne prenesené špáradlom na GM platňu s edicínom a bunky boli kultivované cez noc pri teplote 28 °C v termostate.

Kultúry kvasiniek boli kultivované na pevných médiách v termostate pri teplote 28 °C (pri niektorých pokusoch pri teplote 24 °C a 37 °C – upresnené vo výsledkoch) alebo v tekutých médiách za aeróbných podmienok v Erlenmayerových bankách na teplovzdušnej trepačke (Kühner, Lab-Therm; Multitron Standard, INFORS HT) pri teplote 28 °C.

4.2.3.2 Skladovanie kvasinkových kmeňov

Kvasinkové kmene boli uchovávané v kvasinkových konzervách so skladovacím médiom pri teplote -80 °C, krátkodobo boli udržiavané na GM platniach s edicínom pri teplote 4 °C.

4.2.3.3 Stanovenie počtu buniek a meranie optickej denzity (OD) kultúry

Počet buniek v 1 ml bunkovej suspenzie bol stanovený pomocou Bürkerovej počítacej komôrky v svetelnom mikroskope (Meopta Praha) pri zväčšení 10×20. Koncentrácia bunkovej suspenzie bolo meraná aj na spektrofotometri (Novaspec Plus, Amersham Biosciences) pri vlnovej dĺžke 600 nm. Optická denzita primerane nariadenej bunkovej kultúry (OD = 0,2-0,5) bola meraná v plastovej kyvete s optickou dráhou 1 cm. Ako blank bolo použité príslušné médium.

4.2.3.4 Princíp prípravy kmeňov u *S. cerevisiae*

Príprava kmeňov *S. cerevisiae*

- a) s deléciou príslušného génu,
 - b) s konštitutívnou expresiou génu pod kontrolou promotora TEF,
 - c) produkujúceho proteín fúzovaný s GFP,
- bola založená na procese homológnej rekombinácie.

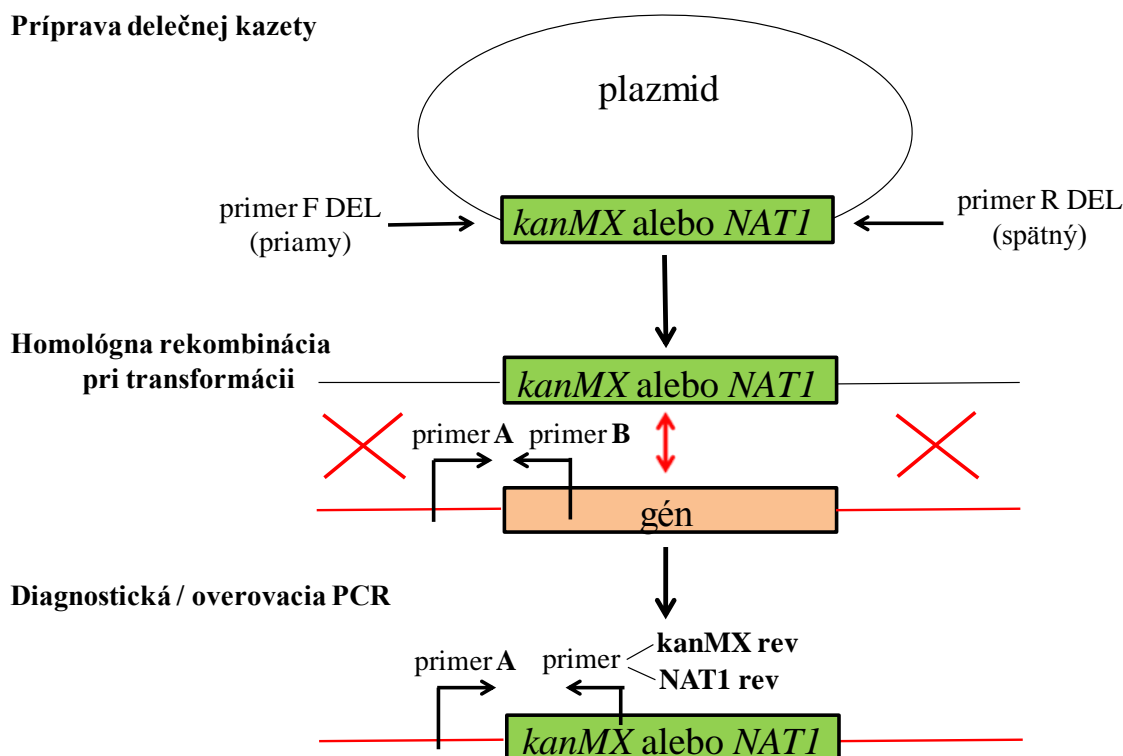
Pri delícii príslušného génu z genómu prírodných diploidných kmeňov *S. cerevisiae* BR-F a PORT bolo nutné odstrániť obe alely génu. Pri delícii 1. alely génu bola zvyčajne využitá delečná kazeta *gén-kanMX* (plazmid pUG6), pri delícii 2. alely génu delečná kazeta *gén-NAT1* (plazmid pAG25). Kmeň s odstránenou jednou alelou génu bol označený ako monodeletant, diploidný kmeň s deletovanými oboma alelami génu ako dvojitý deletant. Postup pri určovaní monodeletantov je popísaný v kap. 4.2.3.14, postup pri určovaní dvojitých deletantov je popísaný v kap. 4.2.3.15.

Príprava kmeňa s deléciou 1. alebo 2. alely génu súhrne zahrňovala: 1. transformáciu kvasinkových buniek LiAc/ss DNA/PEG metódou (kap. 4.2.3.13), 2. izoláciu klonov, 3. diagnostickú PCR, 4. purifikáciu klonov a 5. overovaciu PCR.

Pri príprave kmeňov s konštitutívnou expresiou príslušného génu či C-terminálne značeným génom s GFP sa postupovalo podľa postupu pri určovaní monodeletantov (kap. 4.2.3.14). Typ selekčnej platne a primery pre PCR záviseli na genetickej zmene v kmeni a použitom plazmide.

Schéma delécie príslušného génu od prípravy delečnej kazety až po diagnostickú / overovaciu PCR je znázornená na obr. 13.

Príprava delečnej kazety



Obr. 13. Princíp prípravy delečných kmeňov u *S. cerevisiae* od prípravy delečnej kazety až po diagnostickú / overovaciu PCR. Na priamom i spätom primery je sekvencia homológna ku plazmidom (19 bp u primeru F DEL a 23 bp u primeru R DEL). Delečná kazeta *gén-kanMX* (plazmid pUG6) alebo *gén-NAT1* (plazmid pAG25) obsahovala na svojich koncoch úseky dlhé 45 bp, ktoré boli homológne k sekvenciám pred začiatkom a na konci príslušného génu. To umožnilo deléciu alely príslušného génu procesom homológnej rekombinácie. Pri určovaní pozitívnych transformantov sa postupovalo podľa postupu pri určovaní monodeletantov / dvojitého deletantov (kap. 4.2.3.14 / kap. 4.2.3.15) s využitím diagnostických primerov A, B (špecifické pre daný gén) a primerov *kanMX rev* a *NAT1 rev*. Dĺžka primerov použitých na prípravu delečnej kazety bola 64-68 bp, dĺžka diagnostických primerov bola 20 bp. Sekvencia primerov je uvedená v kap. 4.1.4.

4.2.3.5 Amplifikácia DNA pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR)

Reakcie prebiehali v PCR cykléroch (gradientový PCR termocyklér BIOER XP cyclér; PCR termocyklér BIOER GenePRO; PCR termocyklér „MiniCycler™“, MJ Research). Zloženie reakčnej zmesi a PCR program bol špecifický pre každú reakciu. V tab. 6-8 sú uvedené príklady zloženia zmesi pre danú PCR a zvolený program.

4.2.3.6 Príprava delečnej kazety

Objem reakčnej zmesi bol štandardne 50 μl . Na prípravu delečnej kazety boli použité plazmidy pUG6 alebo pAG25 (Obr. 9). Amplifikovaná DNA bola využitá pri transformácii kvasinkových buniek. Zloženie reakčnej zmesi a podmienky pre PCR sú uvedené v tab. 6.

Reakčná zmes		Podmienky PCR		
PPP PCR Master Mix	25 μl	1.	94 °C (štart reakcie)	5 min
demi H ₂ O	19 μl	2.	94 °C (denaturácia dsDNA)	40 s
primer F DEL (priamy) 5 pmol. μl^{-1}	2 μl	3.	54 °C (pripojenie primerov)	45 s
primer R DEL (spätný) 5 pmol. μl^{-1}	2 μl	4.	72 °C (extenzia)	1:40 min
plazmid 1 ng. μl^{-1}	2 μl	5.	72 °C (dosyntetizovanie)	5 min
		6.	4 °C (ukončenie reakcie)	∞

Tab. 6. Zloženie reakčnej zmesi a podmienky PCR pre prípravu delečnej kazety určenej na transformáciu kvasinkových buniek.

4.2.3.7 Príprava PCR kazety určenej pre vnesenie promotora TEF pred gén

Pri príprave fragmentov bola využívaná tzv. LA PCR („Long and Accurate“ – „dlhá a presná“) – PCR pre amplifikáciu dlhých úsekov DNA s veľkosťou do 20 kbp s vyššou presnosťou. LA DNA polymerázový mix obsahuje zmes dvoch termostabilných DNA polymeráz. Polymeráza Taq DNA je vysoko procesívna, 2. polymeráza má 3'→5' exonukleázovú proofreading aktivitu. Polymerázový mix znižuje možnosť chyby počas syntézy komplementárneho vlákna DNA a umožňuje vysokú rýchlosť syntézy DNA. Presnosť LA DNA polymerázového mixu je približne 5-krát vyššia než polymerázy Taq DNA.

Objem reakčnej zmesi bol štandardne 100 μl . Na prípravu takého PCR fragmentu boli používané plazmidy pYM-N18 alebo pYM-N20 (Obr. 10).

Amplifikovaná DNA bola využitá pri transformácii kvasinkových buniek. Zloženie reakčnej zmesi a podmienky pre PCR sú uvedené v tab. 7.

Reakčná zmes		Podmienky PCR		
PCR H ₂ O	63 μl	1.	94 °C (štart reakcie)	3 min
LA pufor	10 μl	2.	94 °C (denaturácia dsDNA)	25 s
DMSO	4 μl	3.	54 °C (pripojenie primerov)	30 s
primer TEF F (priamy) 5 pmol. μl^{-1}	6 μl	4.	68 °C (extenzia)	2 min
primer TEF R (spätný) 5 pmol. μl^{-1}	6 μl	5.	68 °C (dosyntetizovanie)	5 min
plazmid 1 ng. μl^{-1}	5 μl	6.	4 °C (ukončenie reakcie)	∞
10 mM dNTP	5 μl			
LA DNA Pol Mix	1 μl			

Tab. 7. Zloženie reakčnej zmesi a podmienky PCR pre prípravu PCR kazety určenej pre vnesenie promotora TEF pred zvolený gén pri transformácii kvasinkových buniek.

4.2.3.8 Príprava PCR kazety určenej pre značenie fluorescenčným proteínom GFP

Pri príprave PCR kazety bola využívaná tzv. LA PCR. Objem reakčnej zmesi bol štandardne 100 μ l. Na prípravu PCR kazety určenej na značenie génu fluorescenčným proteínom GFP bol použitý plazmid pKT127 (Obr. 11). Amplifikovaná DNA bola využitá pri transformácii kvasinkových buniek. Zloženie reakčnej zmesi a podmienky pre PCR sú uvedené v tab. 8. Pre účely tejto diplomovej práce boli pripravené kmene s fluorescenčne značeným 3'-koncom génu *SEC61*.

Reakčná zmes	
PCR H ₂ O	63 μ l
LA pufor	10 μ l
DMSO	4 μ l
primer GFP F (priamy) 5 pmol. μ l ⁻¹	6 μ l
primer GFP R (spätný) 5 pmol. μ l ⁻¹	6 μ l
plazmid 1 ng. μ l ⁻¹	5 μ l
10 mM dNTP	5 μ l
LA DNA Pol Mix	1 μ l

Podmienky PCR			
1.	94 °C (štart reakcie)	3 min	
2.	94 °C (denaturácia dsDNA)	25 s	38 cyklov
3.	54 °C (pripojenie primerov)	30 s	
4.	68 °C (extenzia)	2 min	
5.	68 °C (dosyntetizovanie)	5 min	
6.	4 °C (ukončenie reakcie)	∞	

Tab. 8. Zloženie reakčnej zmesi a podmienky PCR pre prípravu PCR kazety určenej na fúziu 3'-konca príslušného génu s GFP pri transformácii kvasinkových buniek.

4.2.3.9 Veľkosť PCR kaziet

V tab. 9 je uvedená veľkosť produktov získaných pri príprave delečnej kazety, PCR kazety určenej pre vnesenie promotora TEF pred gén a PCR kazety určenej na fúziu 3' konca génu s GFP.

Plazmid	Veľkosť PCR kazety
pUG6	1591 bp
pAG25	1286 bp
pYM-N18	1921 bp
pYM-N20	1912 bp
pKT127	2418 bp

Tab. 9. Plazmid a veľkosť PCR kazety.

4.2.3.10 Získanie DNA z kvasinkových buniek pre potreby testovacej PCR (miniizolácia)

Malé množstvo biomasy (rastúcej max. 24 hod.) testovaného kmeňa bolo resuspendované v 40 μ l 20 mM NaOH. Suspenzia sa premiešala (Vortex Genie 2, Scientific Industries) a denaturovala 15 min pri 95 °C (gradientový PCR termocyklér BIOER XP cycler; PCR termocyklér BIOER GenePRO; PCR termocyklér „MiniCyclerTM“, MJ Research). Po

scentrifugovaní pri 2000×g, 1 min (mikrocentrifúga Spectrafuge 24D, Labnet International) bol 1 µl supernatantu použitý ako templát pre PCR reakciu s objemom 10 µl.

4.2.3.11 Overenie genetických zmien konštruktu pomocou PCR

V tab. 10 je uvedené zloženie reakčnej zmesi pre 1 reakciu (10 µl). Teplota a dĺžka doby, pri ktorej sa pripájali diagnostické primery, sa rôznili v závislosti od primerov a očakávanej dĺžky produktu reakcie. Od 24.5.2012 bol v laboratóriu namiesto PPP PCR Master Mixu (Top-Bio) používaný Emerald Amp GT PCR Master Mix (TaKaRa). Tento PCR Master Mix sme začali používať od 24.5.2012, pretože došlo ku zmene dodávateľa.

Reakčná zmes		Podmienky PCR		
PPP PCR Master Mix	5 µl	1.	94 °C (štart reakcie)	5 min
demi H ₂ O	3 µl	2.	94 °C (denaturácia dsDNA)	45 s
priamy primer 5 pmol.µl ⁻¹	1 µl	3.	* (pripojenie primerov)	*
spätný primer 5 pmol.µl ⁻¹	1 µl	4.	72 °C (extenzia)	*
templátová DNA	1 µl	5.	72 °C (dosyntetizovanie)	5 min
		6.	4 °C (ukončenie reakcie)	∞

Tab. 10. Zloženie reakčnej zmesi a podmienky PCR pre overenie genetických zmien konštruktu.

* - teplota podľa doporučenía výrobcu, doba syntézy podľa dĺžky produktu (spravidla 1 min na 1 kbp)

4.2.3.12 Elektroforetická analýza DNA

- 1×TBE pufor

0,2 M	Tris
10 mM	EDTA
0,45 M	kyselina boritá

Horizontálna elektroforéza v agarózovom gély sa využívala na zistenie prítomnosti špecifického PCR produktu (DNA), resp. plazmidu.

Požadované množstvo 0,8% (w/v) agarózy sa v mikrovlnnej rúre rozvarilo v 1×TBE pufri. Po ochladení agarózy na cca 50 °C sa do nej pridal roztok ethidiumbromidu (0,1 µg/ ml gélu) pre zviditeľnenie DNA. Agaróza bola preliata do vaničky z plexiskla s hrebeňom. Po stuhnutí gélu (cca 20 min) bola vanička premiestnená do elektroforetického prístroja (Bio-Rad; OWL EASYCAST™ B1, Thermo Scientific; OWL EASYCAST™ B2, Thermo Scientific), preliata 1×TBE pufrom a do jamiek boli mikropipetou nanosené vzorky a štandard GeneRuler™ DNA Ladder Mix. Aparatúra bola pripojená po dobu 50-70 min k zdroju jednosmerného napätia (Bio-Rad; ENDURO™, Labnet International; Power Station 300,

Labnet International) s napätím 5 V.cm⁻¹. Gél bol následne vyfotografovaný pod UV transluminátorom „Eletronic Dual lightTM“ (Ultra Lum).

4.2.3.13 Transformácia kvasinkových buniek LiAc/ss DNA/PEG metódou

Transformácia prebiehala podľa GIETZ a WOODS (2002).

Do 10 ml tekutého YD média s 0,002% (w/v) edicínom sa sterilne prenieslo 300 µl bunkovej suspenzie, ktorá bola pripravená v 1 ml dest. vody rozsuspendovaním čerstvo narastenej kultúry kvasiniek vo veľkosti špendlíkovej hlavičky. Kvasinková kultúra bola inkubovaná v teplovzdušnej trepačke (Kühner, Lab-Therm; Multitron Standard, INFORS HT) cez noc pri teplote 28 °C.

Ráno bolo inokulum nariadené do 25 ml čerstvého tekutého YD média tak, aby výsledná hustota kultúry odpovedala 5×10⁶ b./ml (OD merané pomocou spektrofotometra Novaspec Plus, Amersham Biosciences). Kultúra bola aeróbne kultivovaná 2 generačné doby (3,5 - 4 hod.) na trepačke pri 28 °C (Kühner, Lab-Therm; Multitron Standard, INFORS HT). Keď OD kultúry nadobudla hodnotu minimálne 2×10⁷ b./ml, kultúra sa scentrifugovala pri 3500×g, 5 min, 22 °C (centrifúga Hettich Universal 320 R, Hettich Zentrifugen). Pelet bol premytý v 25 ml dest. vody a scentrifugovaný pri 3500×g, 5 min, 22 °C (centrifúga Hettich Universal 320 R, Hettich Zentrifugen). Pelet bol resuspendovaný v 1 ml dest. vody, prenesený do 2 ml centrifugačných skúmaviek a centrifugovaný pri 11500×g, 1 min (centrifúga Hettich Mikro 200, Hettich Zentrifugen). Po odobraní supernatantu bola do výsledného objemu pridaná dest. voda tak, aby hustota suspenzie zodpovedala 2×10⁹ b./ml. 100 µl suspenzie (cca 2×10⁸ b.) bolo prenesených do 2 ml mikrocentrifugačnej skúmavky, po scentrifugovaní pri 11500×g, 1 min (centrifúga Hettich Mikro 200, Hettich Zentrifugen) sa odstránil supernatant. Bola pripravená transformačná zmes podľa plánovaného počtu transformácií (+1 navyše) podľa tab. 11.

Počet transformácií	1	5 (6×)	10 (11×)
50 % PEG [µl]	240	1440	2640
1 M LiAc [µl]	36	216	396
ss DNA [µl]	12	70	128
dest. H2O [µl]	52	314	576
celkový objem [µl]	340	2040	3740
PCR kazeta/plazmid	podľa potreby, spravidla: 5 - 20 µl pre PCR kazetu 5 µl pre plazmid (c = 100 ng.µl ⁻¹)		

Tab. 11. Príprava transformačnej zmesi podľa plánovaného počtu transformácií (+ 1 navyše). Salmon sperm DNA (ssDNA) bola pred pridaním do transformačnej zmesi denaturovaná 10 min varením a potom ihneď schladená na ľade. Bola použitá ssDNA s koncentráciou 10 mg.ml⁻¹.

K bunkám bolo pridaných 340 µl transformačnej zmesi a príslušné množstvo PCR kazety alebo plazmidu. Po premiešaní (Vortex Genie 2, Scientific Industries) bola zmes inkubovaná 40 min vo vodnom kúpeli pri teplote 42 °C (Barnstead International, Lab-Line).

Zmes sa scentrifugovala pri 11500×g, 1 min (centrifúga Hettich Mikro 200, Hettich Zentrifugen). Pelet bol resuspendovaný v 1 ml tekutého YD média a následne boli bunky inkubované 3 - 4 hod. v teplovzdušnej trepačke pri teplote 28 °C (Kühner, Lab-Therm; Multitron Standard, INFORS HT). Bunky boli vysiate na selekčné médium s príslušným antibiotikom a inkubované 5-7 dní v termostate pri 28 °C.

4.2.3.14 Postup pri určovaní monodeletantov

1. Zo selekčnej platne, na ktorú boli vysiate bunky pri transformácii, bolo prenesených cca 50 klonov na selekčnú platňu s tým istým antibiotikom (napr. bunky transformované delečnou kazetou *gén-kanMX* a vysiate na selekčnú platňu s G418 boli prenesené na médium s G418).

2. Začlenenie delečnej kazety do požadovaného miesta v genóme (t.j. do miesta génu, ktorý sa deletoval) sa overilo nasledujúci deň diagnostickou PCR. Ako templát slúžila DNA z potencionálnych pozitívnych transformantov, ktoré narástli na selekčnej platni. Negatívnou kontrolou bola DNA netransformovaných buniek rodičovského kmeňa. V reakčnej zmesi sa použil diagnostický primer A (pre príslušný gén) a primer kanMX rev / NAT1 rev (v závislosti od typu delečnej kazety *gén-kanMX* / *gén-NAT1* použitej pri transformácii). Miesta nasadania jednotlivých primerov sú schematicky znázornené na obr. 13.

3. Izoláty, u ktorých sa delécia génu potvrdila diagnostickou PCR (tzv. nepurifikované klony), boli vysiate na GM platne (v prípade klonov odvodených od kmeňa PORT aj na GM + 0,05 mM Se platne) za účelom purifikácie, teda prečistenia od netransformovaných buniek.

4. Morfológia kolónií bola priebežne fotograficky dokumentovaná.

5. Po 3.-5. dňoch od purifikačného výsevu bolo 3-5 kolónií (tzv. purifikované klony) z GM platne prenesených na selekčnú platňu s antibiotikom, voči ktorému by klony mali byť rezistentné.

6. Nasledujúci deň bola overovacou PCR reakciou overená prítomnosť fragmentov A-kanMX rev alebo A-NAT1 rev (v závislosti od typu delečnej kazety použitej pri transformácii). Prítomnosť fragmentu A-kanMX rev alebo A-NAT1 rev potvrdila deléciu príslušného génu u purifikovaných klonov, prítomnosť fragmentu A-B potvrdila prítomnosť druhej, pôvodnej alely príslušného génu.

7. Purifikované klony s potvrdenou deléciou alely vybraného génu boli uložené do skladovacieho média do -80 °C. Následne, ak išlo o prírodný diploidný kmeň, sa tieto klony použili na deléciu 2. alely zvoleného génu.

4.2.3.15 Postup pri určovaní dvojitého deletantu

1. Zo selekčnej platne (spravidla zo selekčnej platne s NAT – na deléciu 2. alely príslušného génu sa zvyčajne použila delečná kazeta *gén-NAT1*), na ktorú boli vysiate bunky pri transformácii, bolo prenesených cca 50 klonov na selekčnú platňu s takým antibiotikom, voči ktorému mal rezistenciu pôvodný monodeletant (u nás obyčajne monodeletant niesol rezistenciu voči G418, teda klony boli prenesené na platňu s G418).

2. Nasledujúci deň bola izolovaná DNA z klonov, ktoré narástli na platni s G418 (a teda by mali byť rezistentné voči G418 i NAT). Reakciou PCR sa overila prítomnosť fragmentov A-kanMX rev a A-NAT1 rev. Miesta nasadenia jednotlivých primerov sú schematicky znázornené na obr. 13.

3. – 4. zhodujú sa v bode 3. a 4. v postupe pri určovaní monodeletantov.

5. Po 3-5 dňoch od výsevu sa niekoľko kolónií (cca 3-5) súčasne prenieslo na oba typy platní – na platňu s antibiotikom G418 i na platňu s NAT.

6. Nasledujúci deň bola izolovaná DNA z klonov, ktoré narástli na oboch typoch selekčných platní (teda by mali mať gény rezistencie voči G418 i NAT). Overovacou PCR reakciou sa overila prítomnosť fragmentov: A-kanMX rev, A-NAT1 rev a A-B, pričom:

- pozitívna reakcia A-kanMX rev svedčila o prítomnosti génu rezistencie voči G418 v mieste, kde bola pôvodne u netransformovaného kmeňa prítomná jedna alela príslušného génu. Došlo teda ku úspešnej homológnej rekombinácii a delícii jednej alely génu.
- pozitívna reakcia A-NAT1 rev svedčila o prítomnosti génu rezistencie voči NAT v mieste, kde bola pôvodne u monodeletanta prítomná druhá alela príslušného génu. Došlo teda ku úspešnej homológnej rekombinácii a delícii druhej alely génu.
- negatívna reakcia A-B znamenala, že príslušný klon už nemal prítomnú žiadnu ďalšiu alelu príslušného génu (A-B fragment sa objavil iba u rodiča).

7. Overené klony s dvojitou deléciou príslušného génu (tzv. purifikované klony) boli uložené do skladovacieho média do -80 °C.

8. 14. deň od výsevu sa platne poslednýkrát fotograficky zdokumentovali a určil sa charakter vrastania kolónií do média prostredníctvom „modrej stopy“ (kap. 4.2.4.2).

4.2.3.16 Odstránenie markerov pomocou creA rekombinázy

- **médium pre indukciu creA rekombinázy**

2% (w/v) galaktóza

1% (w/v) kvasničný autolyzát (šarža 83), pH = 6,5

0,003% (w/v) phleomycín

Pokiaľ bolo u delečného kmeňa nutné odstrániť selekčný marker, bola využitá rekombináza creA, ktorá sa do kmeňa vniesla transformáciou plazmidom pSH65. Gén pre creA rekombinázu je pod kontrolou promotora GAL. Pre indukciu enzymatickej aktivity creA rekombinázy boli bunky prenesené do tekutého média s 2% (w/v) galaktózou.

Po klasickej transformácii kvasiniek metódou LiAc/ss DNA/PEG (kap. 4.2.3.13) plazmidom pSH65 boli bunky vysiate na čerstvé GM s 0,003% (w/v) phleomycínom (pH = 6,5-6,8). Po 3 dňoch kultivácie v termostate pri 28 °C bolo niekoľko kolónií prenesených na platne s phleomycínom. Nasledujúci deň boli stery z niekoľkých kolónií sterilne prenesené do 5 ml tekutého GM so zvýšeným pH (pH = 6,5) a 0,003% (w/v) phleomycínom a boli kultivované v teplovzdušnej trepačke (Kühner, Lab-Therm; Multitron Standard, INFORS HT) cez noc pri teplote 28 °C. Ráno boli bunky z tohto inokula prenesené do 10 ml tekutého média pre indukciu creA rekombinázy v pomere 1:10 (1 ml inokula : 10 ml tekutého média). Bunky boli kultivované 3-4 hod. na trepačke (Kühner, Lab-Therm; Multitron Standard, INFORS HT) pri teplote 28 °C a vysiate v hustote 100 kolónií / platňa na 4 GM platne. Po 3 dňoch kultivácie v termostate boli narastené kolónie prenesené súčasne na GM platňu a selekčnú platňu s G418. Nasledujúci deň boli na základe negatívnej selekcie identifikované klony, ktoré po pôsobení creA rekombinázy stratili rezistenciu voči G418 – teda narástli iba na GM. Tieto klony boli opäť prenesené na GM a na ďalší deň bolo odstránenie selekčného génu overené pomocou reakcie PCR. U vybraných klonov bola overená absencia pSH65.

4.2.3.17 Izolácia chromozomálnej DNA kvasiniek so zymolýzou

- **Mix I**

1 M Tris, pH = 8

0,5 M EDTA, pH = 8

0,003% (w/v) merkptoetanol

0,01% (w/v) zymolýza

- **TE pufor**

10 mM Tris-HCl, pH = 7,5

10 mM EDTA

0,5% (w/v) SDS

Kultúra buniek bola kultivovaná cez noc v 10 ml tekutého YD média v teplovzdušnej trepačke (Kühner, Lab-Therm; Multitron Standard, INFORS HT) pri teplote 28 °C. 1,8 ml kultúry kvasiniek narastenej cez noc sa scentrifugovalo v 2 ml skúmavkách pri 11500×g, 1 min (centrifúga Hettich Mikro 200, Hettich Zentrifugen). Po odobraní supernatantu sa pridalo 150 µl mixu I. Suspenzia sa resuspendovala a inkubovala 1 hod. v termostate pri teplote 37 °C. Bolo pridaných 20 µl 10% (w/v) SDS a 100 µl 7,5 M octanu amónneho, 15 min bola suspenzia inkubovaná pri teplote -80 °C. Po miernom rozmrazení bol obsah skúmaviek scentrifugovaný pri 20000×g, 15 min, 4 °C (centrifúga Hettich Universal 320 R, Hettich Zentrifugen). Po odobraní supernatantu bol jeho objem odmeraný a vyzrážaný 0,6-násobkom objemu izopropanolu. Po 15 min inkubácie v -80 °C bola DNA scentrifugovaná pri 20000×g, 15 min, 4 °C (centrifúga Hettich Universal 320 R, Hettich Zentrifugen). Po vysušení (cca 15 min) bolo k peletu pridaných 100 µl TE pufru a pelet sa nechal rozpustiť v 56 °C.

K roztoku boli pridané 3 µl RNázy ($c = 10 \text{ mg.ml}^{-1}$), obsah sa jemne premiešal a inkuboval 1 hod. v termostate pri teplote 37 °C. Následne bolo pridaných 100 µl TE pufru a 200 µl chloroformu. Skúmavky boli trepané 2-3 min a scentrifugované pri 11500×g, 5 min (centrifúga Hettich Mikro 200, Hettich Zentrifugen). K odobranej hornej fáze bolo pridaných 200 µl chloroformu (resp. rovnaký objem ako objem odobranej vodnej fázy). Skúmavky boli trepané 2-3 min, následne boli scentrifugované pri 11500×g, 5 min (centrifúga Hettich Mikro 200, Hettich Zentrifugen). Horná vodná fáza bola odobraná, odmeral sa jej objem. DNA sa nechala vyzrážať pomocou 2,5-násobku objemu 96% (v/v) etanolu (-20 °C) a 1/10 objemu 3 M NaAc 2 hod. alebo cez noc pri teplote -20 °C.

Roztok sa scentrifugoval pri 20000×g, 15 min, 4 °C (centrifúga Hettich Universal 320 R, Hettich Zentrifugen), pelet sa omyl 80% (v/v) etanolom (-20 °C) a scentrifugoval pri 20000×g, 5 min, 4 °C (centrifúga Hettich Universal 320 R, Hettich Zentrifugen). Po odobraní supernatantu sa DNA nechala vysušiť pri laboratórnej teplote. Suchý pelet sa rozsuspendoval v demiH₂O (alebo pufru a pod. podľa potreby), objem bol zvolený podľa očakávaného množstva DNA. Roztok DNA bol ďalej skladovaný pri -20 °C.

Kvalita izolovanej chromozomálnej DNA sa určila pomocou nanesenia izolovaného, neriedeného genómu na gél, resp. pomocou reakcie PCR s vhodne zvolenými primermi (použil sa 5-krát riedený genóm).

4.2.3.18 Sekvenovanie DNA

Sekvenovanie DNA bolo použité pri overovaní kmeňov s GFP fúziou génu alebo s konštitutívnou expresiou génu pod kontrolou promótora TEF. Objem reakcie na prípravu templátu bol 40 μl . Zloženie reakčnej zmesi a podmienky pre PCR sú uvedené v tab. 12. Genómová DNA bola pripravená pomocou zymolyázy.

Reakčná zmes	
Emerald Amp GT PCR Master Mix	20 μl
PCR H ₂ O	12 μl
priamy primer 5 pmol. μl^{-1}	4 μl
spätný primer 5 pmol. μl^{-1}	4 μl
genómová DNA (5 x riedená)	1,5 μl

Podmienky PCR		
1.	94 °C (štart reakcie)	5 min
2.	94 °C (denaturácia dsDNA)	45 s
3.	* (pripojenie primerov)	*
4.	72 °C (extenzia)	*
5.	72 °C (dosyntetizovanie)	5 min
6.	4 °C (ukončenie reakcie)	∞

Tab. 12. Zloženie reakčnej zmesi a podmienky PCR pre amplifikáciu DNA určenej na sekvenovanie.

* - teplota podľa doporučenía výrobcu, doba syntézy podľa dĺžky produktu (spravidla 1 min na 1 kbp)

Po dokončení PCR bola DNA zrážaná etanolom. Po vysušení bolo k DNA pridaných 30 μl PCR H₂O. Koncentrácia DNA bola odmeraná na mikrokapilárnom spektrofotometri NANODROP 1000 (Thermo Scientific). Kvalita DNA sa sledovala podľa vzťahu absorbancie a vlnovej dĺžky - pri meraní koncentrácie DNA bolo potrebné kontrolovať index A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} . Oba indexy mali byť väčšie než 1,8. Pokiaľ index klesol pod 1,6, produkt bol neseekvenovateľný.

Koncentrácia DNA [$\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$] bola vypočítaná podľa vzťahu: Constant [$\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$] * A_{260} , kde Constant = 50 $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. V tab. 13 je znázornená požadované množstvo DNA v sekvenačnej reakcii vo vzťahu k dĺžke templátu.

PCR produkt	Množstvo DNA
100 - 200 bp	1 - 3 ng
200 - 500 bp	3 - 10 ng
500 - 1000 bp	5 - 20 ng
1000 - 2000 bp	10 - 40 ng
< 2000 bp	20 - 50 ng

Tab. 13. Požadované množstvo DNA v objeme 14 μl vo vzťahu k dĺžke templátu.

Na základe týchto sekvenačných pravidiel Laboratoře sekvenace DNA, PřF UK bola pripravená sekvenačná vzorka s celkovým objemom 14 μl (Tab. 14).

Zloženie vzorky určenej na sekvenovanie	
priamy primer 5 pmol. μl^{-1}	1 μl
PCR H ₂ O	13-„x“ μl
DNA	„x“ μl

Tab. 14. Zloženie vzorky určenej na sekvenovanie. Množstvo DNA - „x“ bolo vypočítané na základe jej koncentrácie. Koncentrácia DNA [$\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$] bola vypočítaná podľa vzťahu: Constant [$\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$]*A₂₆₀, kde Constant = 50 $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

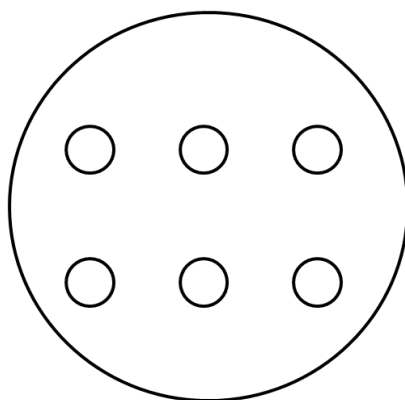
Sekvenačná vzorka bola odovzdaná na sekvenačnú analýzu do Laboratoře sekvenace DNA, PřF UK. Výstup zo sekvenátora bol analyzovaný v programe Sequence Scanner v 1.0.

4.2.4 Analýza a charakterizácia kmeňov

U pripravených kmeňov s deléciou a konštitutívnou expresiou génu *HAC1* bola sledovaná morfológia kolónií, charakter vrastania kolónií do agaru či zmena tvaru buniek v porovnaní s rodičovským kmeňom. Boli vykonané rastové analýzy kmeňov za neselektívnych podmienok a testovaná ich citlivosť voči rôznym typom inhibítorov. U kmeňov s C-terminálnou fúziou proteínu s GFP bola detekovaná prítomnosť značeného proteínu pomocou fluorescenčného mikroskopu, spektrofotometra a imunodetekciou.

4.2.4.1 Sledovanie morfológie kolónií

Po príprave kmeňov s deléciou alebo zvýšenou expresiou príslušného génu bola ich morfológia sledovaná dvoma typmi výsevu: výsevom monokolónií alebo výsevom makrokolónií. Štandardne bola morfológia kmeňov sledovaná na monokolóniách, ktoré boli vysiate na platňu s hustotou cca 60 kolónií / platňa. Pri výseve makrokolónií bolo nakvapkaných 6×10 μl suspenzie (východzia suspenzia pripravená resuspendovaním biomasy približne vo veľkosti špendlíkovej hlavičky v 1 ml vody) kvasinkových buniek tak, aby sa kvapky nachádzali vo vzdialenosti cca 2 cm od seba (Obr. 14).



Obr. 14. Charakter nanášania makrokolónií na Petriho misku. Vzdialenosť kvapiek je cca 2 cm.

Bunky boli vysievané na GM platne, v prípade kmeňov odvodených od kmeňa PORT aj na platne GM + 0,05 mM Se. Pri purifikácii kmeňov po transformácii boli bunky príp. vysiate aj na selektívne platne s antibiotikom. Morfológia kolónií bola sledovaná v čase a zaznamenávaná fotograficky (farebná kamera JENOPTIK Progres® MF^{cool}, objektív Cosmicar; osvetľovací systém Kaiser RS1).

4.2.4.2 „Modrá stopa“

- **roztok CBMA**

0,025% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250

40% (v/v) metanol

10% (v/v) kyselina octová

Na určenie charakteru vrastania kolónií do príslušného média sa používala tzv. „modrá stopa“ („blue footprint“). K vizualizácii stôp bol využitý farbiaci roztok CBMA. Na základe intenzity zafarbenia bolo možné určiť, ako hlboko vrastali kolónie do média a akú kresbu vytvorili.

Kolónie boli z média jemne zoškrabané a platne boli premyté dest. H₂O, aby sa z nich odstránili zvyšky kolónií. Destilovaná H₂O sa po cca 10-15 min z platní odsala vývevou a platne boli preliate farbiacim roztokom CBMA. Platne boli ponechané na trepačke cez noc. Po odsatí farbiaceho roztoku vývevou boli stopy kolónií v agare vyfotené.

4.2.4.3 Stopa kolónie rastúcej na membráne

Charakter vrastania kolónií do agaru bolo možné určiť aj po odstránení membrány s pórmí (Nucleopore Membrane Circles, \varnothing membrány 47 mm, \varnothing pórov 5,0 μm , Nucleopore®), na ktorej rástli .

Bunky príslušného kmeňa boli vysiate na GM s membránou s hustotou 200 b./platňa. Tretí deň po výseve bola membrána s „nadzemnou“ časťou kolónií odstránená pinzetou. Stopa vytvorená „podzemnou“ časťou kolónií bola sledovaná fluorescenčným mikroskopom Leica DMR pri celkovom zväčšení 100 \times .

4.2.4.4 Rezy kolóniami

Pre porovnanie smeru rastu (vertikálny / horizontálny) a výšky kolónií rodičovského kmeňa a kmeňa s deléciou a zvýšenou expresiou príslušného génu boli pripravené vertikálne rezy kolóniami.

Niekoľko kolónií kmeňa bolo preliatych 2 ml 2% (w/v) agarózy. Po stuhnutí agarózy (cca 2 min) boli celé kolónie z platne vyrezané a stredom kolónie bol žiletkou vedený priečny rez. Vertikálny rez kolóniou bol zaznamenaný fotograficky.

4.2.4.5 Rastová analýza

Cieľom rastových analýz za neselektívnych podmienok bolo v čase porovnať rýchlosť rastu. Bola sledovaná plocha kolónie [mm^2], hmotnosť kolónie [μg] a hmotnosť biomasy na jednotku plochy kolónie [$\mu\text{g}.\text{mm}^{-2}$] u rodičovského kmeňa, kmeňov s deléciou a kmeňov so zvýšenou expresiou príslušného génu. V čase bola vedená fotografická dokumentácia platní, odoberaná a vážená biomasa kolónií porovnávaných kmeňov. V niektorých prípadoch bola odobraná biomasa zmrazená v tekutom dusíku a neskôr využitá pri imunodetekcii.

Štandardne boli na výsev buniek porovnávaných kmeňov použité GM a GM + 0,05 mM Se platne (v prípade kmeňov odvodených od kmeňa PORT) staré 7 dní. Kmene boli štandardne vysievané s hustotou 100 kolónií / platňa. Na niektorých platniach bol však počet kolónií nižší, príp. vyšší. V takom prípade snahou bolo, aby bola v každý deň odberu zozbieraná biomasa o zhodnej priemernej hustote kolónií na miskú.

V ktoré dni a z akého počtu misiek bola biomasa štandardne odoberaná, je znázornené v tab. 15. Biomasa každého porovnávaného kmeňa bola v daný deň odobraná do troch skúmaviek.

deň odberu biomasy	3.	4.	5.	7.	10.
počet misiek použitých na zber biomasy 1 kmeňa	5	4	3	2	2

Tab. 15. Dni a počet misiek, z ktorých bola zozbieraná biomasa v daný deň pri rastovej analýze. Minimálna hmotnosť biomasy, ktorú bolo potrebné odobrať v daný deň pre 1 kmeň pre získanie relevantných výsledkov, bola 100 mg.

Platne boli pred zberom biomasy označené a vyfotografované. Počet kolónií a celková plocha kolónií na platni boli počítané pomocou programu Colony Counter (SCHIER a KOVAR 2013). Biomasa kolónií bola v daný deň odobraná do predvážených mikroskúmaviek.

Dáta o počte a celkovej ploche kolónií, hmotnosti biomasy zozbieraných kolónií v daný deň pre daný kmeň, boli vyhodnotené v programe MS Excel. Na základe týchto dát možné graficky znázorniť, ako sa v čase mení plocha kolónie [mm^2], hmotnosť kolónie [μg] a hmotnosť biomasy na jednotku plochy kolónie [$\mu\text{g} \cdot \text{mm}^{-2}$] medzi porovnávanými kmeňmi. Hmotnosť biomasy na jednotku plochy kolónie [$\mu\text{g} \cdot \text{mm}^{-2}$] v podstate charakterizuje vertikálnu výšku kolónie na mm^2 . Tieto dáta charakterizovali daný kmeň ako kmeň s horizontálnym alebo vertikálnym rastom.

4.2.4.6 Kvapkový test

Cieľom kvapkových testov bolo porovnať odolnosť kmeňov s deléciou príslušného génu a zvýšenou expresiou príslušného génu v porovnaní s rodičovským kmeňom v prítomnosti rôznych typov inhibítorov a pri rôznych teplotách. Miera citlivosti/odolnosti kmeňa voči príslušnému typu inhibítora bola porovnávaná s rodičovským kmeňom na úrovni miery nárastu kmeňa v jednotlivých kvapkách, t.j. ako hustá bunková suspenzia (ktorá kvapka) bola schopná na danom inhibítore ešte rásť.

Východzia suspenzia s hustotou $2 \cdot 10^8$ buniek bola pripravená zozbieraním buniek zo 4 dni starých kolónií kultivovaných pri teplote 28°C na GM. Následne bola pripravená desiatková riediaca rada a pomocou multikanálovej mikropipety bolo na platňu v rade nanesených 6 kvapiek o objeme $5 \mu\text{l}$, kde počet buniek v kvapke klesal od $10^6 \rightarrow 10^1$ buniek v poslednej kvapke. Miera odolnosti jednotlivých kmeňov na príslušnom médiu s inhibítorom bola fotograficky dokumentovaná spravidla 3. a 7. deň.

Koncentrácie inhibítorov boli vybraté na základe predchádzajúcich pokusov testovania citlivosti u rodičovských kmeňov.

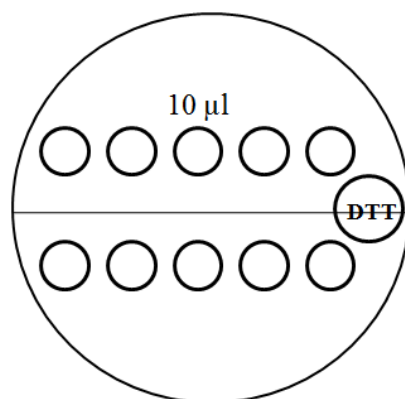
- **Vybrané inhibítory a ich koncentrácie v médiu**

- YD + 0,3 mM $3\text{Cd SO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$
- YD + 3 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (pre kmene odvodené od kmeňa PORT)
- YD + 1 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (pre kmene odvodené od kmeňa BR-F)
- GM + 0,3 mM 2-deoxy-D-glukóza
- GM + 0,003% (w/v) CFW (Calcofluor White Stain)
- GM + 0,02% (w/v) CR (Congo Red)

- príprava: ako YD / GM médium, po sterilizácii pridať potrebné množstvo inhibítora

4.2.4.7 DTT test

Cieľom tzv. DTT testu bolo zistiť, či daný kmeň je alebo nie je rezistentný voči DTT (DL-Dithiothreitol). DTT indukuje UPR zmenou redoxného stavu v lumene ER, čím narušuje tvorbu disulfidických väzieb v proteínoch a spôsobuje defekt v ich štruktúre. Vplyv DTT bol testovaný v gradientovom usporiadaní. Schéma experimentu je popísaná na obr. 15.



Obr. 15. Schéma DTT testu. Na GM sa cca 0,5 cm od okraja platne sterilne vyhlbila jamka. Tesne vedľa seba bolo nakvapkaných päť 10 µl kvapiek s hustotou bunkovej suspenzie 10-20 b./10µl. Boli nakvapkané 2 rady s piatimi kvapkami, každý rad obsahoval bunky odlišného kmeňa. Následne sa do jamky pridalo 150 µl 0,4 M DTT a platne boli inkubované v termostate pri 28 °C. Vplyv koncentračného gradientu DTT na rast kolónií dvoch rôznych kmeňov bol fotograficky dokumentovaný 3. a 7. deň.

4.2.4.8 Spektrofluorimetrické stanovenie intenzity fluorescence

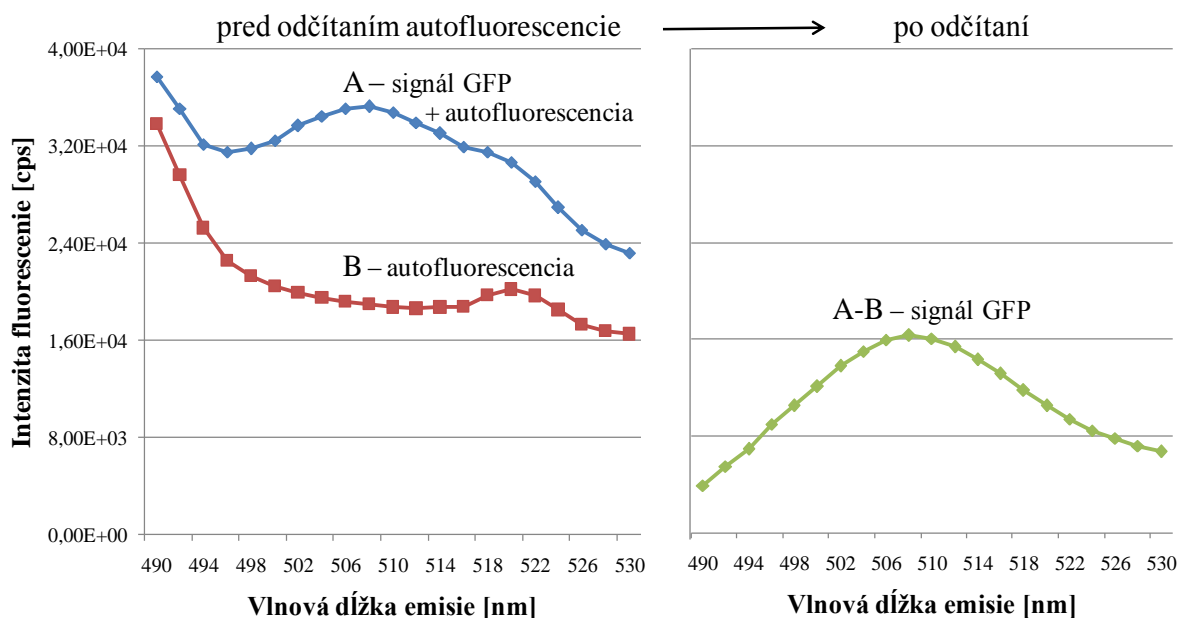
Na meranie intenzity fluorescence buniek kmeňov produkujúcich proteín fúzovaný s GFP bol využitý spektrofluorimeter FluoroMax-P (Horiba Jobin Yvon). Intenzita fluorescence buniek bola snímaná buď z monokolónií z platní s riedkym výsevom (10-20 kolónií/plaťňa) alebo z makrokolónií za selektívnych či neselektívnych podmienok. Fluorescencia kolónií bola meraná *in situ* pomocou externej sondy. Výsev monokolónií, resp.

nanášanie makrokolónií určených na meranie intenzity fluorescence prebiehal vždy na čerstvé platne (staré 2-4 dni).

Intenzita fluorescence monokolónií mohla byť snímaná pri dostatočnej veľkosti kolónií (zvyčajne od 5. dňa). Pre určenie zmeny intenzity fluorescence GFP značeného proteínu príslušného kmeňa v čase, bola fluorescence snímaná niekoľko dní – štandardne 5. deň, 7. deň, 10. deň. U každého kmeňa bola v daný deň meraná intenzita fluorescence minimálne zo 6 kolónií z 3 rôznych platní. Kolónie museli byť v dostatočnej vzdialenosti od seba, intenzita fluorescence bola snímaná z ich stredu.

Pri nanášaní makrokolónií určených na meranie intenzity fluorescenčného signálu bolo nakvapkaných 6×10^7 μ l suspenzie s orientačnou koncentráciou 10^7 b./ml tak, aby sa kvapky nachádzali vo vzdialenosti cca 2 cm od seba. Intenzitu fluorescence makrokolónií bolo možné merať 3 dni od ich nanesenia, resp. v závislosti od charakteru experimentu.

Paralelne s meraním intenzity fluorescence kmeňa s GFP značeným proteínom, bola snímaná aj autofluorescencia jeho „negatívnej kontroly“, teda toho istého kmeňa/konstruktu, ale bez GFP značenia príslušného proteínu. Od hodnoty intenzity fluorescence kmeňa s GFP značeným proteínom bola následne odčítaná hodnota autofluorescencie jeho „negatívnej kontroly“ (Obr. 16).



Obr. 16. Príklad spektrofluorometrického stanovenia intenzity fluorescence makro-/ monokolónií príslušného kmeňa. Od hodnoty intenzity fluorescence kmeňa s GFP značeným proteínom (**A** - označené modrou v grafe naľavo) sa odčíta hodnota autofluorescencie jeho „negatívnej kontroly“ - toho istého kmeňa/konstruktu, ale bez GFP značenia príslušného proteínu (**B** - označené červenou v grafe naľavo). Intenzita vlastného fluorescenčného signálu GFP (**A-B**) je znázornená zelenou v grafe napravo. Príklad z merania intenzity fluorescenčného signálu Sec61-GFP u 7 dní starých monokolónií kmeňa PORT-Sec61p-GFP.

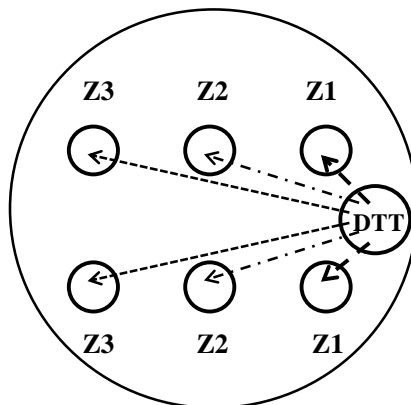
GFP bol excitovaný svetlom o vlnovej dĺžke 475 nm, emisné spektrum bolo snímané v rozsahu 500-530 nm.

Vo výsledkoch sú uvedené grafy po odčítaní príslušnej „negatívnej“ kontroly. Na spracovanie dát bol používaný Microsoft Office Excel.

V priebehu diplomovej práce sa vylepšili podmienky pre meranie a zlepšilo sa nastavenie spektrofotometra.

- ***Spektrofluorimetrické stanovenie intenzity fluorescence po pôsobení DTT***

Intenzita fluorescence kmeňov s génovou fúziou *SEC61* s GFP bola meraná aj za prítomnosti koncentračného gradientu DTT ako induktora UPR. Schéma experimentu je znázornená a popísaná na obr. 17.



Obr. 17. Schéma experimentu pri meraní intenzity fluorescence kmeňov s génovou fúziou *SEC61* s GFP za prítomnosti koncentračného gradientu 0,4 M DTT ako induktora UPR. Štandardne po 3 dňoch od nanesenia makrokolónií na GM sa cca 0,5 cm od okraja platne sterilne vyhlbila jamka a do nej bolo pridaných 150 μ l 0,4 M DTT. Vplyv koncentračného gradientu DTT na makrokolónie bol meraný spektrofotometrom nasledujúci deň (po 15 hod.) v zóne 1 (Z1 – najbližšie pri zdroji DTT), zóne 2 (Z2) a zóne 3 (Z3). Vzdialenosť makrokolónií je cca 2 cm.

4.2.4.9 Mikroskopické pozorovanie

Pri pozorovaní buniek bol používaný fluorescenčný mikroskop Leica DMR. Príslušný preparát bol pozorovaný pomocou Nomarského kontrastu vo viditeľnom svetle. Pole s bunkami s fluorescenčne značeným proteínom pomocou GFP bolo pozorované zároveň pomocou Nomarského kontrastu vo viditeľnom svetle (kontrola) a následne s filtrom pre fluorescenciu GFP (filter 513852, excitačný filter 470/40, dichromatické zrkadlo pre zelený fluorescenčný proteín; excitácia modrá / emisia zelená) bez Nomarského kontrastu s celkovým zväčšením 1000 \times . Štandardná doba snímania pre Sec61p-GFP bola 3 s, pre Flo11p-GFP 5 s. Obráz bol snímaný monochromatickou kamerou JENOPTIK Progres® MF^{cool}.

4.2.4.10 Konfokálna mikroskopia

Na príslušné médium boli vysiate bunky s hustotou 300 b./platňa. Priechne rezy 3 dni starých kolónií boli sledované 2-fotónovým konfokálnym mikroskopom. Sledovanie bolo prevádzané prof. RNDr. Zdenou Palkovou, CSc. a RNDr. Libušou Váchovou, CSc. vo Fyziologickom ústave AV ČR v Krči, za čo srdečne ďakujem.

4.2.5 Metódy práce s proteínmi

4.2.5.1 Odber buniek pre Western blot analýzu

200-300 mg kultúry buniek odobratých z výsevu bolo prenesených do predváženej skúmavky a okamžite zmrazených v tekutom dusíku. Vzorky boli uskladnené v -80 °C.

4.2.5.2 Príprava kvasinkových lyzáto – rozbíjanie buniek

- **MES pufo s inhibítormi proteáz**

10 mM MES, pH = 6,8 (pH upravené roztokom NaOH)

1/50 objemu 2xPIC

(aliquót od výrobcu rozpustený v 50% objeme DMSO), bol použitý 2×koncentrovaný)

8 mM DTT

4 mM PMSF

2 mM AEBSF

0,5% (v/v) NP40

Vzorky uskladnené v -80°C boli prenesené na ľade a podľa ich mokrej váhy k nim bolo pridaných 200 – 300 µl MES pufru s inhibítormi proteáz. Po rozsuspendovaní sa biomasa previedla do skúmaviek naplnených do cca ½ sklenenými guľčkami. Na mechanické rozbitie buniek bol použitý desintegrátor FASTPREP, kde boli bunky rozbíjané 5×20 s, medzitým sa 2 min chladili na ľade. Po premiešaní (Vortex Genie 2, Scientific Industries) bol lyzáť centrifugovaný pri 680×g, 2 min, 4 °C (centrifúga Hettich Universal 320 R, Hettich Zentrifugen). Supernatant bol centrifugovaný pri 680×g, 2 min, 4 °C (centrifúga Hettich Universal 320 R, Hettich Zentrifugen). V supernatante bola následne stanovená koncentrácia proteínov Bradfordovou metódou (kap. 4.2.5.3). Vzorky boli celý čas udržiavané na ľade.

4.2.5.3 Stanovenie koncentrácie proteínov pomocou Bradfordovej metódy

Bradfordová metóda je založená na posune absorpčného maxima po väzbe činidla Coomassie Brilliant Blue R 250 na molekulu proteínu a umožňuje kolorimetricky stanoviť koncentráciu proteínov.

V tab. 16 je uvedené, ako sa pripravil blank, štandard s výslednou koncentráciou $5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ BSA a vzorka proteínu.

blank	800 μl demi H_2O	10 μl $10\times$ riedeného MES pufru s inhibítormi	200 μl Bradfordovo činidlo
štandard	800 μl demi H_2O	10 μl BSA s výslednou koncentráciou vo vzorke $5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	200 μl Bradfordovo činidlo
vzorka proteínu	800 μl demi H_2O	10 μl $10\times$ riedeného lyzátu	200 μl Bradfordovo činidlo

Tab. 16. Príprava vzoriek na stanovenie koncentrácie proteínov pomocou Bradfordovej metódy.

Zmesi boli premiešané a inkubované 10 min pri laboratórnej teplote. Meranie koncentrácie proteínov prebiehalo pomocou spektrofotometra (Novaspec Plus, Amersham Biosciences) pri A_{595} . Každé meranie bolo uskutočnené v duplikátoch, z ktorých bol vypočítaný priemer. Z absorbancie štandardu BSA ($A_{595} = 0,3$; pri koncentrácii $5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) bola vypočítaná koncentrácia vzoriek. Namerané hodnoty boli vyhodnotené pomocou programu MS Excel. Vzorky boli uchovávané pri teplote -80°C , pred ich uložením bola ku každej vzorke pridaná 1/25 objemu 0,2 M PMSF.

4.2.5.4 Vertikálna elektroforéza v polyakrylamidovom gély (SDS-PAGE)

- **30% (w/v) akrylamid**
29% (w/v) akrylamid
1% (w/v) N, N'-metylén-bis-akrylamid
- **separačný pufor (pH = 8,8)**
1,5 M Tris
0,4% (w/v) SDS
upraviť pH na 8,8 pomocou 1 M HCl
- **zaostrovací pufor (pH = 6,8)**
0,5 M Tris
0,4% (w/v) SDS
upraviť pH na 6,8 pomocou 1 M HCl

- **SDS elektródový pufo**

0,05 M Tris, pH = 8,3

0,384 M glycín

0,1% (w/v) SDS

Všetky vyššie uvedené alikvóty je možné uchovávať pri 4 °C.

- **vzorkový (denaturačný) pufo**

2,5 M Tris, pH = 6,8

50% (v/v) glycerol

0,02% (w/v) BFM

10% (w/v) SDS

Vzorkový pufo je možné uchovávať pri -20 °C.

Vertikálna elektroforéza v polyakrylamidovom gély slúžila na elektroforetickú analýzu proteínov v denaturačnom prostredí SDS (SDS-PAGE), pričom dochádzalo ku deleniu proteínov migrujúcich v elektrickom podľa ich molekulovej hmotnosti.

Sklá prečistené liehom sa zafixovali v upínači skiel a umiestnili do nalievacieho stojanu (Bio-Rad). 5 ml roztoku separačného gély (namiešaného podľa tab. 17) sa prenieslo medzi sklá a prevrstvilo 200 µl izopropanolu. Po zpolymerizovaní (cca 1 hod.) bol gély premytý od izopropanolu demi H₂O, ktorá bola odsatá filtračným papierom. Na stuhnutý separačný gély bol nanesený roztok zaostrovacieho gély (zloženie uvedené v tab. 18), do ktorého bol ihneď zasunutý hrebeň. Po zpolymerizovaní (cca 15-20 min.) bol z gély vytiahnutý hrebeň, jamky boli naplnené SDS elektródovým pufrom (4 °C) a sklá s polyakrylamidovým gély sa vložili do elektroforetickej aparatury (Bio-Rad), do ktorej sa nalialo dostatočné množstvo SDS elektródového pufru. K vzorke s 5 µg proteínov bola pridaná 1/5 objemu vzorkového pufru, 1/10 objemu 0,4 M DTT a príslušné množstvo MES pufru s inhibítormi. Vzorka bola inkubovaná pri 95 °C po dobu 5 min. Po ochladení boli vzorky nanesené. Bol používaný proteínový štandard PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder.

Aparatúra bola pripojená k zdroju jednosmerného prúdu (ENDURO™, Labnet International) - napätie bolo nastavené na hodnotu 250 V, prúd na konštantnú hodnotu 50 mA (uvedené pre 2 gély). Elektroforéza obvykle prebiehala 50 - 60 min.

Zloženie / Koncentrácia gélu	7,5 %
30% akrylamid	3 ml
separačný pufor (pH = 8,8)	3 ml
demi H ₂ O	6 ml
10% persíran amónny	30 µl
TEMED	12 µl

Tab. 17. Zloženie roztoku 7,5% separačného gélu (uvedené pre 2 gély). Po pridání 10% persíranu amónneho a TEMEDU bol roztok premiešaný a okamžite aplikovaný medzi sklá. 10% persíran amónny sa pripravil tesne pred použitím.

30% akrylamid	0,78 ml
zaostrovač pufor (pH = 6,8)	1,5 ml
demi H ₂ O	3,66 ml
10% persíran amónny	30 µl
TEMED	12 µl

Tab. 18. Zloženie roztoku zaostrovacieho gélu (uvedené pre 2 gély). Po pridání 10% persíranu amónneho a TEMEDU bol roztok premiešaný a okamžite aplikovaný medzi sklá. 10% persíran amónny sa pripravil tesne pred použitím.

4.2.5.5 Western-blot

- **PVDF membrána** (Immobilon-P, Millipore)
- **Western blot pufor**
 - 0,025 M Tris
 - 0,192 M glycín
 - 10% (v/v) metanol
- **farbiaci roztok**
 - 40% (v/v) metanol
 - 10% (v/v) kyselina octová
 - 0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250

po namiešaní a rozpustení zložiek roztok prefiltrovať
- **odfarbovací roztok**
 - 40% (v/v) metanol
 - 10% (v/v) kyselina octová

Po rozobraní elektroforetického prístroja (Bio-Rad) sa odstránil zaostrovací gél, pre orientáciu sa odrezal ľavý horný roh separačného polyakrylamidového gélu. PVDF membrána bola pred prenosom aktivovaná 5 min v metanole, 5 min bola premývaná v demi H₂O a 15 min vo Western blot pufri. Na držiak (Bio-Rad) sa naskladal koberček, 2 filtračné papiere Whatman, polyakrylamidový gél, PVDF membrána, 2 filtračné papiere Whatman, koberček, pričom všetky vrstvy boli najprv namočené vo Western blot pufri. Zdroj (ENDUROTM, Labnet International) bol nastavený na konštantných 120 V, 250 mA po dobu 1 hod a 30 min (uvedené pre 2 PVDF membrány). Po ukončení prenosu sa z membrány odstihol proteínový štandard. Membrána sa vložila na 20 s do farbiaceho roztoku, prepláchla v odfarbovacom roztoku a 4-5 min. inkubovala v čistom odfarbovacom roztoku. Po uschnutí sa membrána vyfotila i s proteínovým štandardom.

4.2.5.6 *Imunodetekcia*

- **PBS, pH = 7,4**
 10 mM Na₂HPO₄.12 H₂O
 0,15 M NaCl
 upraviť pH pomocou 0,2 M H₃PO₄
 (PBS pre prípravu 1% kazeínu sa neupravuje)

- **GFP (B-2) HRP**, myšia monoklonálna protilátka IgG_{2a}, 200 µg.ml⁻¹ (Santa Cruz Biotechnology)

Membrána sa odfarbila metanolom, prepláchla 5 min v demi H₂O, 5 min v PBS (pH = 7,4), blokovala 20-30 min v PBS-1% kazeín, omyla 2 min v PBS (pH = 7,4) a nechala sa inkubovať 1 hod. s anti-GFP protilátkou nariadenou v PBS-1% kazeíne a Tweene 20 riedenom v pomere 1:2000 (na membránu aplikovaných 15-20 ml). Po inkubácii membrány s protilátkou sa membrána premývala v 20 – 40 ml PBS s Tweenom riedenom v pomere 1:4000 po dobu 3×5 min. V tab. 19 je popísané riedenie protilátky v závislosti od typu použitého detekčného substrátu, doba inkubácie membrány so zvoleným detekčným substrátom a doba expozície membrány s filmom.

riedenie protilátky	1:1000	1:20000
detekčný substrát	Pico substrát	Femto substrát
doba inkubácie membrány s detekčným substrátom	10 min	5 min
doba expozície membrány s filmom	15 min - 1 hod	20 s – 1 min

Tab. 19. Riedenie protilátky, typ použitého detekčného substrátu, doba inkubácie membrány s detekčným substrátom a doba expozície membrány s filmom. Detekčný substrát bol na membránu aplikovaný vo fólii o objeme 1 ml, alikvóty v pomere 1:1 (pripravený tesne pred použitím).

4.2.5.7 Farbenie gélov striebrom

- **Fix I**
 - 40 % (v/v) etanol
 - 10 % (v/v) kyselina octová
- **Fix II**
 - 0,01 M tetracionát draselný
 - 0,829 M acetát sodný
 - 30 % (v/v) etanol
 - 0,5 % (v/v) glutaraldehyd
- **Ag roztok**
 - 0,012 M dusičnan strieborný
 - 0,025 % (v/v) formaldehyd
- **vyvolávací roztok**
 - 0,217 M uhličitan draselný
 - 0,04 mM tiosíran sodný
 - 0,015 % (v/v) formaldehyd

Farbenie gélov striebrom patrí medzi nešpecifické, nekvantitatívne metódy zviditeľnenia proteínov. Farbenie prebieha po SDS-PAGE elektroforéze (využitý proteínový štandard Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards #161-0375EDU). Strieborné ióny sa viažu na –SH a COOH skupiny, každý proteín sa farbí striebrom v závislosti na jeho aminokyselinovom zložení.

Po dokončení SDS-PAGE elektroforézy sa gél nechal inkubovať 1 hod. v roztoku fix I. Cez noc sa gél nechal inkubovať v čerstvo pripravenom roztoku fix II. Roztok do rána

zožltol. Gél sa opláchol 4×15 min v demi H₂O a nechal sa inkubovať v čerstvo pripravenom roztoku striebra 30 min. Gél sa opláchol demi H₂O po dobu 1 min a bol inkubovaný vo vyvolávacom roztoku 10 min, resp. podľa potreby, aby gél nebol veľmi tmavý. Gél bol opláchnutý demi H₂O a inkubovaný v 1 % (v/v) kyseliny octovej 10 min pre zvýšenie zaostrenia zafarbenia. Gél bolo možné uchovávať pri 4 °C v 10 % (v/v) glycerole.

5 Výsledky

5.1 Izolácia kmeňov

Cieľ: *Izolácia kmeňov potrebných pre účely tejto práce.*

V rámci tejto diplomovej práce boli pripravené kmene s deléciou génu *HAC1*, zvýšenou expresiou génu *HAC1* pod kontrolou promótoru TEF a kmene s fúziou génu *SEC61* s GFP. Tieto kmene boli odvodené od dvoch diploidných, „divokých“ kmeňov *S. cerevisiae* PORT a BR-F-Flo11p-GFP.

U prírodných kmeňov *S. cerevisiae* PORT a BR-F-Flo11p-GFP viedla delécia génu *HAC1* ku zníženiu vrásčitosti štruktúrovaných kolónií. Efekt delécie génu *HAC1* som sa neskôr rozhodla overiť aj u dvoch haploidných laboratórnych kmeňov BY4742 a Σ^h . Zároveň som pripravila kmeň s konštitutívnou expresiou génu *HAC1* pod kontrolou promótoru TEF odvodený od kmeňa BR-S. Kmeň BR-S vytvára na médiu s 3% glycerolom hladké kolónie a preto ma zaujímalo, či konštitutívna expresia nebude viesť ku indukcií vrásčitého fenotypu.

Podrobná charakteristika kmeňov je uvedená v kap. 4.1.1., zoznam pripravených kvasinkových kmeňov je v kap. 4.1.2, použité vektory v kap. 4.1.3, primery, ich názov a poloha voči kódujúcej sekvencii génu, sú uvedené v kap. 4.1.4.

Pri príprave kmeňov s deléciou génu *HAC1* závisel postup a počet transformácií na počte alel génu *HAC1* v genóme. U diploidných kmeňov PORT a BR-F-Flo11p-GFP bolo nutné odstrániť obe alely génu *HAC1*. Dvojkrokovou transformáciou sa procesom homológnej rekombinácie najprv odstránila prvá alela génu (delečná kazeta pripravená z plazmidu pUG6), druhá alela bola odstránená pomocou delečnej kazety pripravenej z plazmidu pAG25. U haploidných kmeňov bola delécia jedinej alely génu *HAC1* prevedená jednokrokovou transformáciou s využitím delečnej kazety pripravenej z plazmidu pAG25.

Princíp prípravy kmeňov u *S. cerevisiae* je podrobne popísaný v kap. 4.2.3.4, príprava delečnej kazety v kap. 4.2.3.6, postup pri určovaní monodeletantov v kap. 4.2.3.14, postup pri určovaní dvojitého deletantov v kap. 4.2.3.15.

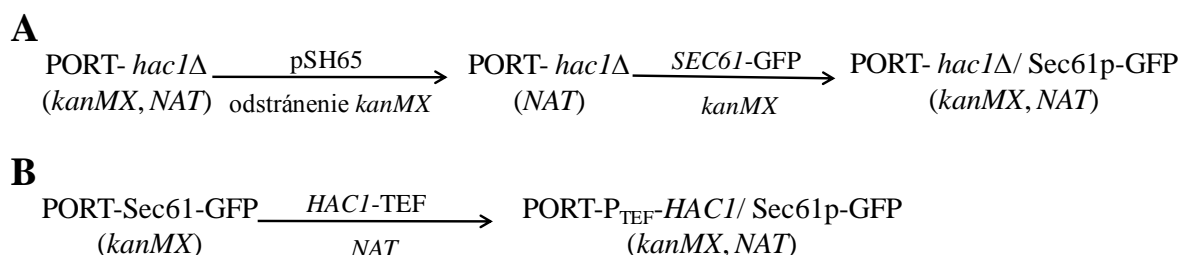
Pri príprave kmeňov so zvýšenou expresiou génu *HAC1* odvodených od kmeňov PORT, BR-F-Flo11p-GFP a BR-S sa konštitutívna expresia dosiahla výmenou promótoru. Jednokrokovou transformáciou (kazeta pripravená z plazmidu pYM-N18) sa prirodzený

promótor nahradil silným, konštitutívnym promótorom TEF. Nejde teda o expresiu z plazmidu, promótorová oblasť génu sa nahrádza na pôvodnom mieste. Pri príprave týchto kmeňov sa promótor TEF vždy inzertoval do oblasti promótoru iba jednej alely génu. Nepodarilo sa mi získať žiaden klon s konštitutívnou expresiou génu *HAC1* z oboch alel.

Pri izolácii klonov som postupovala podľa postupu pri určovaní monodeletantov (kap. 4.2.3.14). Princíp prípravy PCR kazety určenej pre vnesenie promótoru TEF pred gén je popísaný v kap. 4.2.3.7.

5.1.1 Príprava kmeňov s viacnásobnými zmenami genotypu

Okrem vyššie uvedených kmeňov (kap. 5.1) boli pripravené i kmene s viacnásobnými zmenami genotypu. Boli tak izolované kmene s deléciou a zvýšenou expresiou génu *HAC1* odvodené od kmeňa PORT s C-terminálnou fúziou Sec61p s GFP. Postup prípravy týchto kmeňov sa líšil. Postup prípravy kmeňa PORT-*hac1Δ*/ Sec61-GFP je znázornený a popísaný na obr. 18A, postup prípravy kmeňa PORT-P_{TEF}-*HAC1*/ Sec61p-GFP je znázornený a popísaný na obr. 18B.



Obr. 18. Schéma prípravy kmeňov PORT-*hac1Δ*/ Sec61-GFP a PORT-P_{TEF}-*HAC1*/ Sec61p-GFP s viacnásobnou zmenou genotypu. **A** - Východným kmeňom bol kmeň PORT-*hac1Δ* transformovaný delečnými kazetami, ktoré nahradili jednu alelu génu *HAC1* génom *kanMX* a druhú alelu génu *HAC1* génom *NAT*. Keďže je gén *kanMX* ohraničený loxP miestami, bolo možné tento gén odstrániť pomocou creA rekombinázy kódovanej plazmidom pSH65 (viď kap. 4.2.3.16). Po transformácii PCR kazetou určenou pre značenie *SEC61* fluorescenčným proteínom GFP (postup prípravy v kap. 4.2.3.8) bol do genómu opäť vnesený gén *kanMX*.

B - Pri izolácii kmeňa PORT-Sec61p-GFP bol RNDr. Schierovou, Ph.D. do genómu vnesený gén *kanMX* z kazety pripravenej z plazmidu pKT127. Na výmenu prirodzeného promótoru za konštitutívny promótor TEF bola využitá kazeta pripravená z plazmidu pYM-N20, ktorý nesie gén *NAT*.

Pri príprave kmeňov bolo izolovaných, overených a charakterizovaných vždy viac klonov. Pre diplomovú prácu bol za účelom podrobnej analýzy vybraný jeden klon, pokiaľ nie je uvedené inak.

5.2 Význam využitia kmeňov s fúziou Sec61p s GFP

Gén *SEC61* patrí medzi gény, ktoré obsahujú vo svojej promótorovej sekvencii UPRE, a teda je pozitívne regulovaný TF Hac1p pri indukcii stresu v ER (TRAVERS a kol. 2000).

Pre štúdium stresu v ER som si preto vytvorila kmene s C-terminálnou fúziou Sec61p s GFP (viď kap. 5.1.1). Takto pripravené kmene s deléciou a zvýšenou expresiou génu *HAC1* sú vývojovo a morfológicky identické s príslušným neznačeným kmeňom rovnakého genotypu. Proteín Sec61p je súčasťou translokónu a lokalizuje do ER, ktorého membrána je asociovaná s plazmatickou membránou a perinukleárnym priestorom. Bližšie informácie o Sec61p sú uvedené v kap. 2.7.

Kmene s fúziou Sec61p s GFP odvodené od kmeňa BR-F-Flo11p-GFP pripravené neboli, pretože do tohto rodičovského kmeňa nebolo možné vniesť ďalší GFP marker.

5.3 Význam využitia kmeňov s fúziou Flo11p s GFP

Proteín Flo11p je nevyhnutný pre vytvorenie štruktúrovanej architektúry kvasinkovej kolónie podobnej biofilmu (ŠŤOVÍČEK a kol. 2010, VOPÁLENSKÁ a kol. 2010). Jeho expresia koreluje s morfológiou kolónie – najvyššia expresia génu *FLO11* je u najvýraznejšie štruktúrovaných kolónií a jeho delécia vedie ku strate schopnosti tvoriť vrásčité kolónie (ŠŤOVÍČEK a kol. 2010). Bližšie informácie o Flo11p sú uvedené v kap. 2.1.1.

Zistili sme, že delécia génu *HAC1* negatívne ovplyvňuje vrásčitosť kolónií. U kmeňov odvodených od BR-F-Flo11p-GFP (s N-terminálnou fúziou Flo11p s GFP, ktorý bol získaný od RNDr. Šťovíčka, Ph.D.) som tak mohla sledovať vplyv delécie a zvýšenej expresie génu *HAC1* na hladinu proteínu Flo11p v porovnaní s rodičovským kmeňom.

V kmeni BR-F-Flo11p-GFP lokalizuje Flo11p-GFP na bunkový povrch a kmeň BR-F-Flo11p-GFP je vývojovo a morfológicky identický s kmeňom BR-F.

V priebehu diplomovej práce bol RNDr. Schierovou, Ph.D. pripravený kmeň PORT-Flo11p-GFP, ktorý sa však morfológicky líšil od kmeňa PORT, preto nebol využitý na ďalšie analýzy a prípravu delečných kmeňov PORT-*hac1Δ*/ Flo11p-GFP.

5.4 Analýza kmeňov s deléciou a zvýšenou expresiou génu *HAC1* odvodených od kmeňa PORT

5.4.1 Morfologické charakteristiky kolónií kmeňov s deléciou a zvýšenou expresiou *HAC1* odvodených od kmeňa PORT

Ciel': Morfologicky charakterizovať kmene s deléciou a konštitutívnou expresiou génu *HAC1* pod kontrolou promótoru *TEF* odvodené od kmeňa PORT na GM a GM+0,05 mM Se.

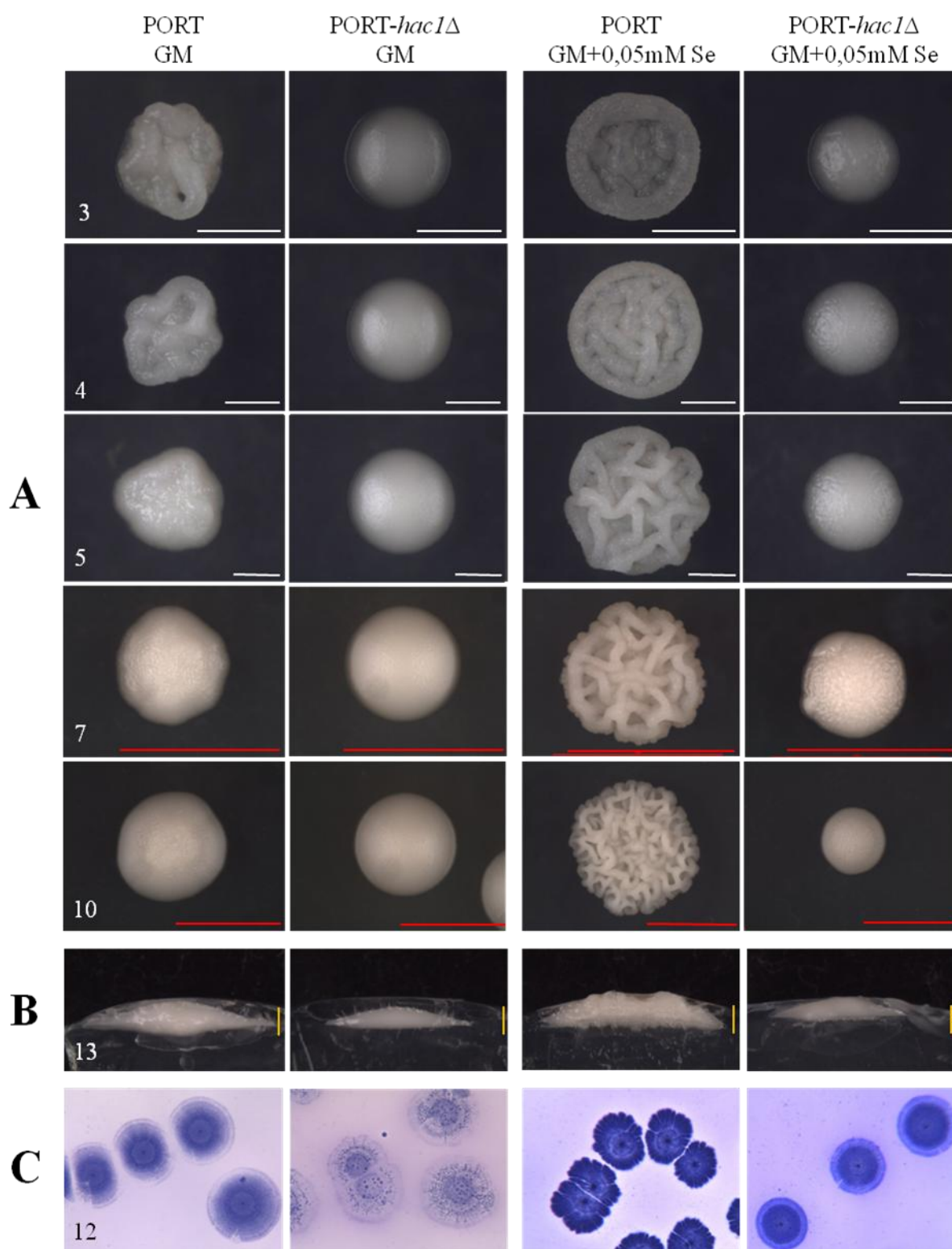
Prírodný, „divoký“ kmeň *S. cerevisiae* PORT vytvára pri raste na GM hladké až polovrásčité kolónie. V prítomnosti nízkej koncentrácie selénanu sodného (GM+0,05 mM Se) vytvára štruktúrované, vrásčité kolónie. Kmeň s deléciou génu *HAC1* nie je schopný vytvárať štruktúrované kolónie na GM+0,05 mM Se a hladké kolónie vytvára na GM i GM+0,05 mM Se (Obr. 19A).

13. deň vývoja kolónií som porovnávala úroveň vertikálneho rastu kolónií (Obr. 19B). Na GM i na médiu so selénanom sú hladké kolónie kmeňa *hac1Δ* nižšie ako kolónie rodičovského kmeňa na príslušnom médiu. Pri príprave vertikálnych rezov som si niekoľko kolónií preliala 2% (w/v) agarózou a po jej stuhnutí som celé kolónie z platne vyrezala a stredom kolónie som žiletkou viedla priečny rez (Metóda 4.2.4.4)

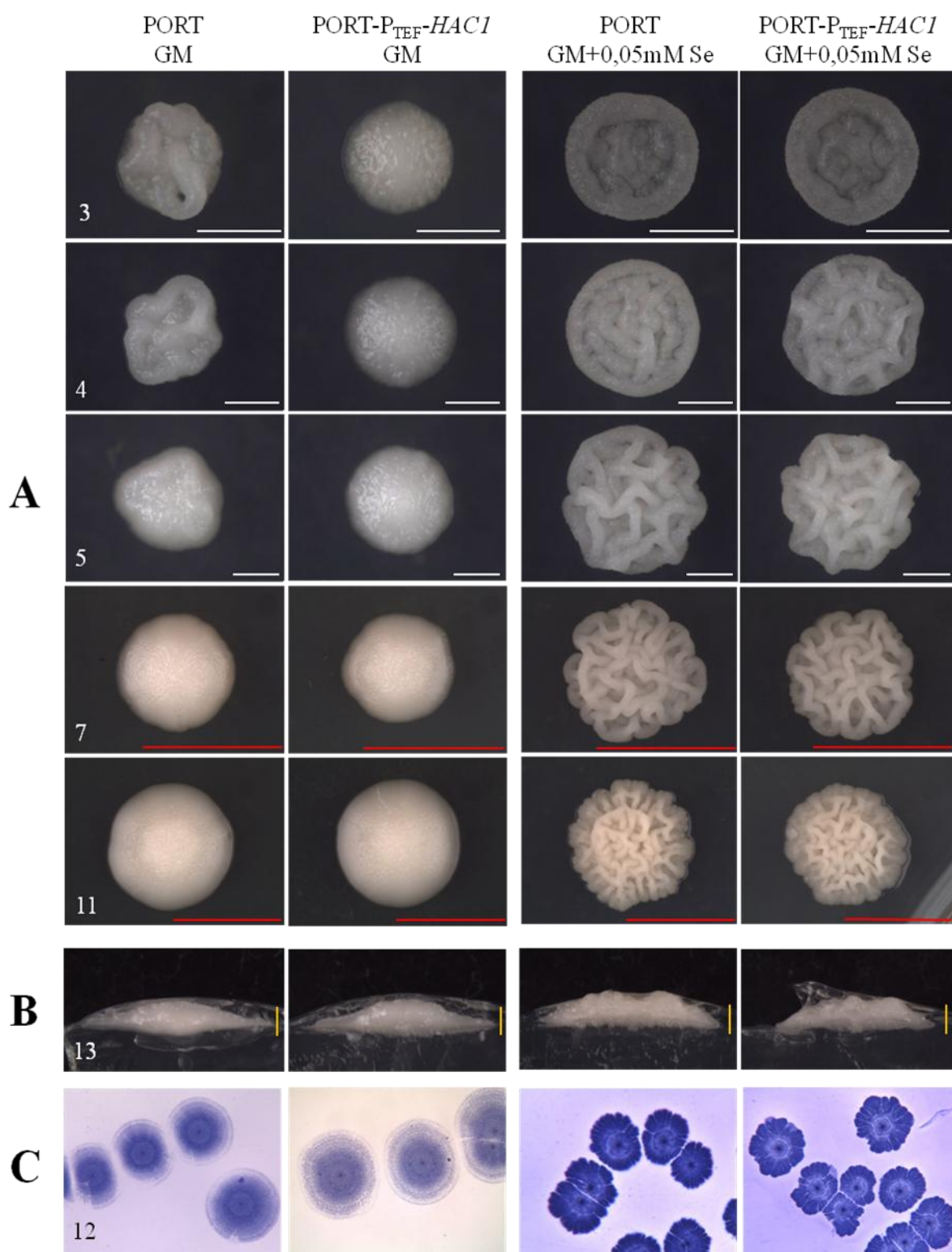
„Modrou stopou“ som v 12. deň vývoja kolónií porovnávala charakter ich vrastania do média (Metóda 4.2.4.2). Rodičovský kmeň PORT vytvára na GM pravidelnú stopu s celistvým tvarom. Do média so selénanom zarastá pevnejšie než do GM a jeho stopa nie je homogénna - má kyticovitú štruktúru s nepravidelným okrajom (Obr. 19C) a je veľmi podobná „modrej stope“ kolónií kmeňa BR-F-Flo11p-GFP na GM (viď ďalej Obr. 30C).

Hoci kmeň *hac1Δ* vytvára hladké kolónie na GM i na médiu so selénanom, charakter vrastania kolónií do príslušného média sa líšil. Do GM zarastá kmeň *hac1Δ* výrazne menej než rodičovský kmeň (Obr. 19C). Do média s nízkou koncentráciou selénanu vrastá kmeň *hac1Δ* pevnejšie než do GM – môžeme pozorovať veľkú centrálnu, pomerne pevne vrastajúcu časť a menej pevne vrastajúci periférny prstenec. Napriek odlišnému charakteru stopy rodičovského kmeňa PORT a kmeňa s deléciou génu *HAC1* je zrejmé, že selénan pozitívne pôsobí na bunkovú adhezivitu a vrastanie do média.

U kmeňov so zvýšenou expresiou génu *HAC1* pod kontrolou promótoru *TEF* sa morfológia klonov na GM i GM+0,05 mM Se, úroveň vertikálneho rastu a charakter vrastania do príslušného média v porovnaní s rodičovským kmeňom nezmenili (Obr. 20A, B, C).



Obr. 19. Morfologické charakteristiky kolónií kmeňa *S. cerevisiae* PORT-*hac1Δ* v porovnaní s rodičovským kmeňom PORT na GM a GM+0,05 mM Se. A – morfogénéza kolónií (biela mierka 1 mm, červená mierka 5 mm), B – priečny rez kolónie (oranžová mierka 1 mm), C – určenie charakteru vrastania kolónií do média pomocou „modrej stopy“. V ľavom dolnom rohu snímky je uvedený vek kolónie v dňoch.

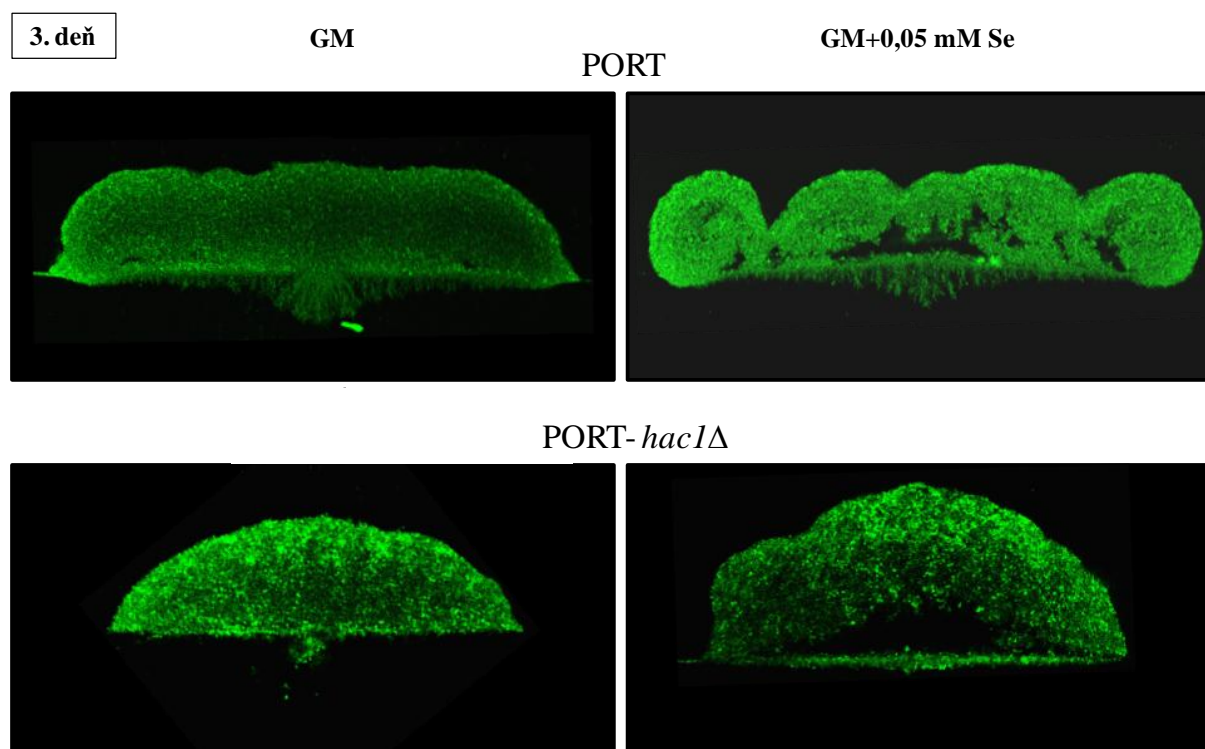


Obr. 20. Morfológické charakteristiky kolónií kmeňa *S. cerevisiae* PORT- P_{TEF} -*HAC1* v porovnaní s rodičovským kmeňom PORT na GM a GM+0,05 mM Se. **A – morfogénéza kolónií (biela mierka 1 mm, červená mierka 5 mm), **B** – priečny rez kolónie (oranžová mierka 1 mm), **C** – určenie charakteru vrastania kolónií do média pomocou „modrej stopy“. V ľavom dolnom rohu snímky je uvedený vek kolónie v dňoch.**

Pomocou 2-fotónového konfokálneho mikroskopu bola porovnaná architektúra 3 dni starých kolónií kmeňov PORT a *hac1Δ* a charakter ich vrastania do GM a GM+0,05 mM Se (Obr. 21, foto: PALKOVÁ a VÁCHOVÁ).

Rodičovský kmeň PORT má na GM takmer homogénny, hladký tvar kolónií. Na médiu so selénanom majú jeho kolónie členitý, štruktúrovaný charakter s indukovanou tvorbou dutiny v centrálnej časti. Kmeň PORT nezarastá do média homogénne – na oboch typoch médií sa v centrálnej spodnej časti kolónií tvoria miesta koncentrovanej adhézie pseudohýf do agaru. Krátke „koreničky“ sa objavujú i v okrajových častiach kolónií (Obr. 21 hore).

U kmeňa *hac1Δ* nie je efekt selénanu na architektúru kolónie tak výrazný ako u rodičovského kmeňa. Kolónie sú na oboch typoch médií takmer hladké. Na médiu so selénanom sa u kmeňa *hac1Δ*, podobne ako u kmeňa PORT, tvorí centrálna dutina. U kmeňov s deléciou génu *HAC1* chýba zarastanie do príslušného média (Obr. 21 dole).



Obr. 21. Architektúra 3 dni starých kolónií kmeňov *S. cerevisiae* PORT a PORT-*hac1Δ* na GM a GM+0,05 mM Se. Vertikálne priečne rezy kolónií ofarbené Calcofluor White. Vizualizácia z 2-fotónového konfokálneho mikroskopu. Ide o ilustračné fotografie, veľkostný pomer môže byť ovplyvnený hustotou výsevu (foto: PALKOVÁ a VÁCHOVÁ).

5.4.2 Rastové analýzy kmeňov s deléciou a zvýšenou expresiou *HAC1* odvodených od kmeňa PORT za neselektívnych podmienok

Cieľ: *Vykonať rastové analýzy pripravených kmeňov s deléciou a konštitutívnou expresiou génu *HAC1* pod kontrolou promótora *TEF* odvodených od kmeňa PORT na GM a GM+0,05 mM Se a v čase porovnať prírastok v ploche kolónií, hmotnosti kolónií a hmotnosti kolónií na jednotku plochy.*

Pri rastovej analýze kmeňov *hac1Δ*, *P_{TEF}-HAC1* a PORT na GM i GM+0,05 mM Se sa preukázal prorastový efekt selénanu na rast rodičovského kmeňa PORT. Kolónie rastúce na médiu so selénanom dosahovali vyššiu priemernú plochu kolónií (Obr. 23A), hmotnosť kolónií (Obr. 22, Obr. 23B) i hmotnosť kolónií na jednotku plochy (Obr. 22, Obr. 23C).

Kmeň s deléciou génu *HAC1* mal na GM do 5. dňa vývoja vegetatívny rast porovnateľný s úrovňou rastu kmeňa PORT. Od 6.-7. dňa rástla plocha jeho kolónií pomalšie a kolónie boli menšie. Priemerná hmotnosť biomasy kolónie kmeňa *hac1Δ* bola na GM po celú dobu rastovej analýzy (3. – 10. deň) nižšia v porovnaní s kmeňom PORT (Obr. 22).

Rastová analýza kmeňov na GM+0,05 mM Se ukázala, že vo všetkých troch zmienených parametroch (priemerná plocha kolónií, hmotnosť kolónií, hmotnosť kolónií na jednotku plochy) sú výrazné rozdiely medzi kmeňom *hac1Δ* a PORT (Obr. 22). Tieto rozdiely vyplývajú z morfológie kolónií kmeňa *hac1Δ* – sú malé, hladké, majú výrazne spomalený vegetatívny rast a zníženú úroveň vertikálneho rastu (Obr. 19A, B). Schopnosť rastu kolónií vertikálnym smerom popisujú grafy porovnávajúce hmotnosť kolónií na jednotku plochy - kmene s vrásčitou morfológiou rastú viac vertikálne, a preto majú vyššiu priemernú hmotnosť na jednotku plochy.

Vzájomným porovnaním charakteru vývoja hladkých kolónií kmeňa *hac1Δ* na GM i GM+0,05 mM Se sa ukázalo, že kolónie sú menšie na médiu so selénanom. Priemerná hmotnosť kolónií je porovnateľná do 7. dňa vývoja. V 10. deň je hmotnosť kolónií kmeňa *hac1Δ* vyššia na GM+0,05 mM Se a takisto je vyššia hodnota priemernej hmotnosti kolónií na jednotku plochy, čo poukazuje na lepšiu vertikálny rast, hoci sú v horizontálnom rozmere menšie než kolónie na GM (Obr. 22).

Pri rastovej analýze kmeňov *hac1Δ*, *P_{TEF}-HAC1* a PORT na GM i GM+0,05 mM Se sa ukázalo, že v ploche kolónií, hmotnosti kolónií a hmotnosti kolónií na jednotku plochy nie je zásadný rozdiel medzi rodičovským kmeňom PORT a kmeňom so zvýšenou expresiou génu *HAC1* (Obr. 22).

V tab. 20A, B je uvedené, aký bol celkový počet zozbieraných kolónií a celková hmotnosť biomasy kolónií u oboch nezávislých rastových analýzach, z ktorých sa následne vypočítavali hodnoty všetkých troch sledovaných parametrov pre príslušný deň (plocha kolónií, hmotnosti kolónií a hmotnosti kolónií na jednotku plochy).

V tab. 20C, D je uvedené, aký bol priemerný počet kolónií na jednej platni pre daný deň/ kmeň/ médium. Táto hodnota by mala byť porovnateľná u oboch nezávislých výsevov. Bolo dôležité, aby hustota kolónií na jednej miske nebola vyššia ako 100 a tak nedochádzalo ku kontaktnej inhibícii rastu aspoň do 7. dňa vývoja kolónií. Počas 7.-12. dňa od výsevu je však rast kolónií kontaktnou inhibíciou ovplyvnený, a to i napriek pomerne riedkej hustote výsevu, čo sa odráža na vyššej hodnote smerodajnej odchýlky pri meraniach z týchto dní.

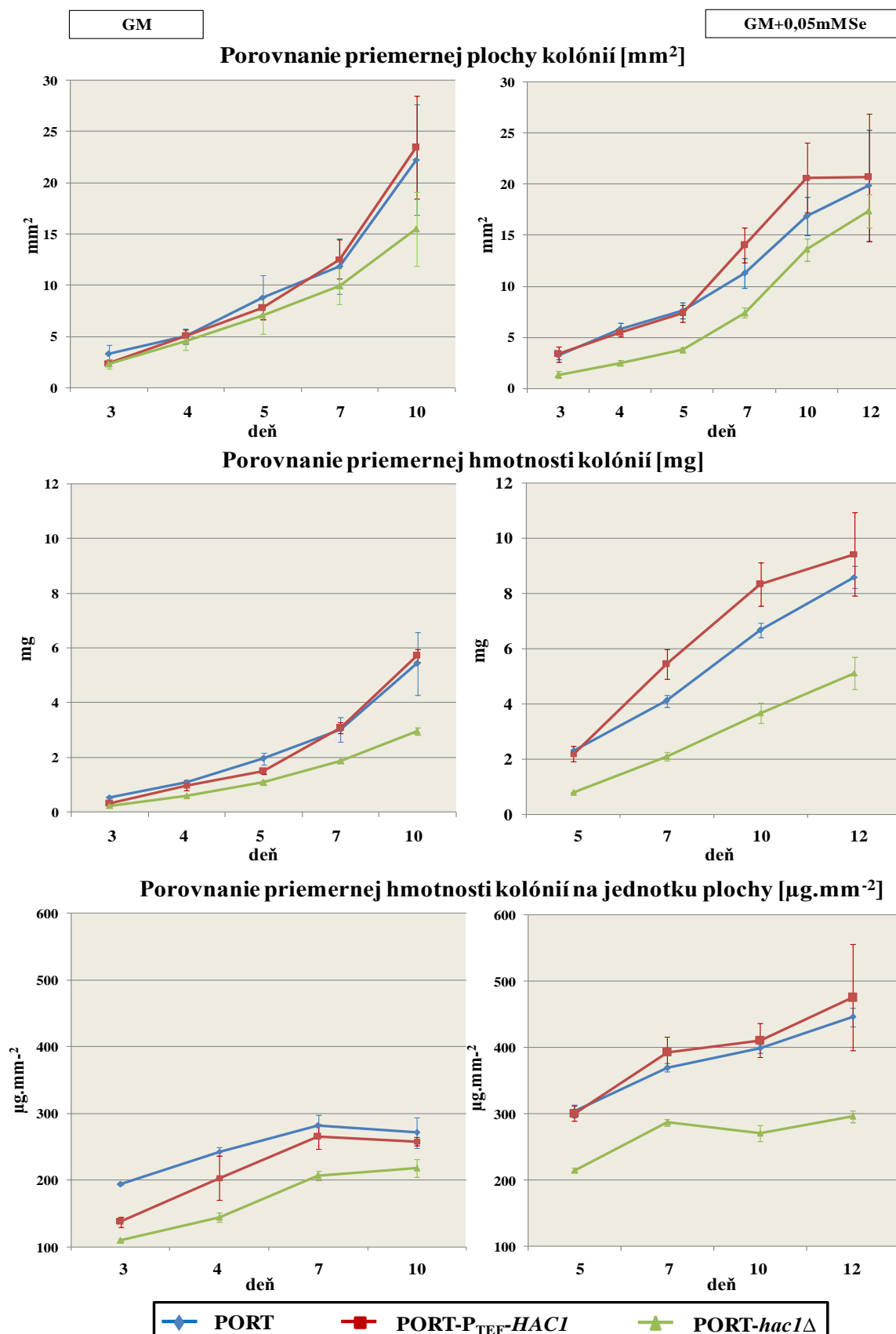
V tab. 20E, F je t-test poukazujúci na štatisticky významné rozdiely vyplývajúce z porovnávania plochy kolónií, hmotnosti kolónií a hmotnosti kolónií na jednotku plochy pre kmene PORT a $P_{TEF}\text{-}HAC1$ a PORT a $hac1\Delta$ na GM (4. deň vývoja) a GM+0,05 mM Se (5. deň vývoja).

Rastové analýzy kmeňov $hac1\Delta$, $P_{TEF}\text{-}HAC1$ a PORT na GM a GM+0,05 mM Se boli vykonávané nezávisle na sebe z dôvodu veľkej náročnosti pokusu, čo sa týka počtu vysiatych misiek a následného fotenia misiek v daný deň, odoberania, váženia biomasy a pod. Rastová analýza kmeňov na GM bola zopakovaná 3×, rastová analýza na GM+0,05 mM Se bola zopakovaná 2× s obdobnými výsledkami.

Na základe týchto výsledkov a významných rozdielov medzi kmeňmi na oboch typoch médií, som sa rozhodla previesť ešte „skrátenu“ rastovú analýzu kmeňov s deléciou a zvýšenou expresiou génu *HAC1* zo spoločného výsevu na GM a GM+0,05 mM Se. Následne som porovnala priemernú plochu ich kolónií (3.-5. deň), priemernú hmotnosť kolónií (5. deň) a hmotnosť kolónií na jednotku plochy (5. deň) (stĺpcové grafy - Obr. 23A-C). Táto rastová analýza opäť potvrdila významný prorastový efekt selénanu na rast rodičovského kmeňa PORT a kmeňa so zvýšenou expresiou génu *HAC1*. Vo všetkých troch sledovaných parametroch sa potvrdili štatisticky významné rozdiely medzi GM a GM+0,05 mM Se (Tab. 21C). Opačná situácia je u kmeňa s deléciou génu *HAC1*, u ktorého bol inhibičný vplyv selénanu na rast potvrdený i t-testom (Tab. 21C).

V tab. 21A je uvedené, aký bol celkový počet zozbieraných kolónií a celková hmotnosť biomasy kolónií v 5. deň v rámci rastovej analýzy zo spoločného výsevu. V tab. 21B je uvedené, aký bol priemerný počet kolónií na jednej platni pre daný deň/ kmeň/ médium. Vďaka spoločnému výsevu každého kmeňa na GM a GM+0,05 mM Se sú tieto hodnoty takmer identické a výsledky veľmi dobre porovnateľné.

Vzájomne nezávislé rastové analýzy kmeňov na GM a GM+0,05 mM Se



Obr. 22. Rastové analýzy kmeňov *S. cerevisiae* odvodených od kmeňa PORT na GM a GM+0,05 mM Se. Porovnanie rozdielov v priemernej ploche kolónií [mm²], hmotnosti kolónií [mg] a hmotnosti kolónií na jednotku plochy [μg.mm⁻²] v čase. Obe rastové analýzy boli vykonané nezávisle na sebe.

A	GM			
	Počet zozbieraných kolónií / hmotnosť biomasy [g]			
		PORT	PORT-P _{TEF} -HACI	PORT-hac1Δ
	3. deň	759 / 0,416	859 / 0,280	1297 / 0,303
	4. deň	720 / 0,800	674 / 0,665	917 / 0,558
	5. deň	390 / 0,755	481 / 0,715	677 / 0,738
	7. deň	437 / 1,281	329 / 1,009	495 / 0,933
	10. deň	320 / 1,671	298 / 1,702	365 / 1,077

B	GM+0,05 mM Se			
	Počet zozbieraných kolónií / hmotnosť biomasy [g]			
		PORT	PORT-P _{TEF} -HACI	PORT-hac1Δ
	5. deň	463 / 1,065	376 / 0,821	422 / 0,339
	7. deň	435 / 1,789	275 / 1,488	344 / 0,724
	10. deň	402 / 2,678	304 / 2,512	385 / 1,404
	12. deň	318 / 2,731	289 / 2,662	348 / 1,755

C	Priemerný počet kolónií na platni, GM					
		3. deň	4. deň	5. deň	7. deň	10. deň
	PORT	50,1	60	43,3	72,8	53,3
	PORT-P _{TEF} -HACI	57,2	56,1	53,4	54,8	49,7
	PORT-hac1Δ	86,4	76,4	75,2	82,5	60,8

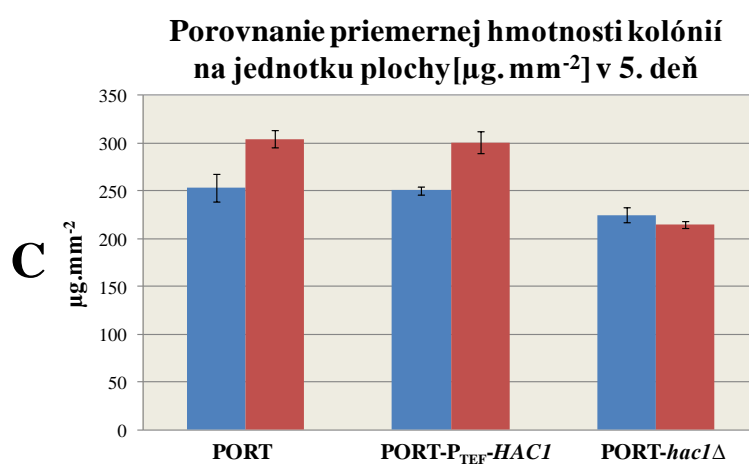
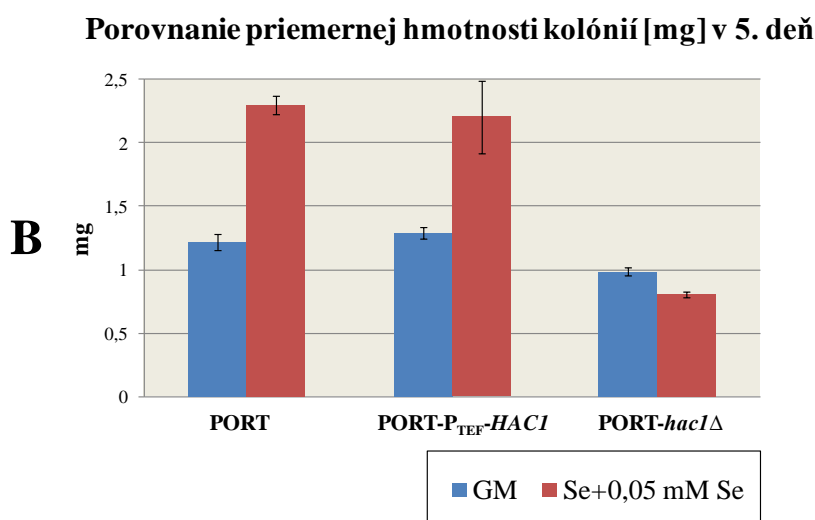
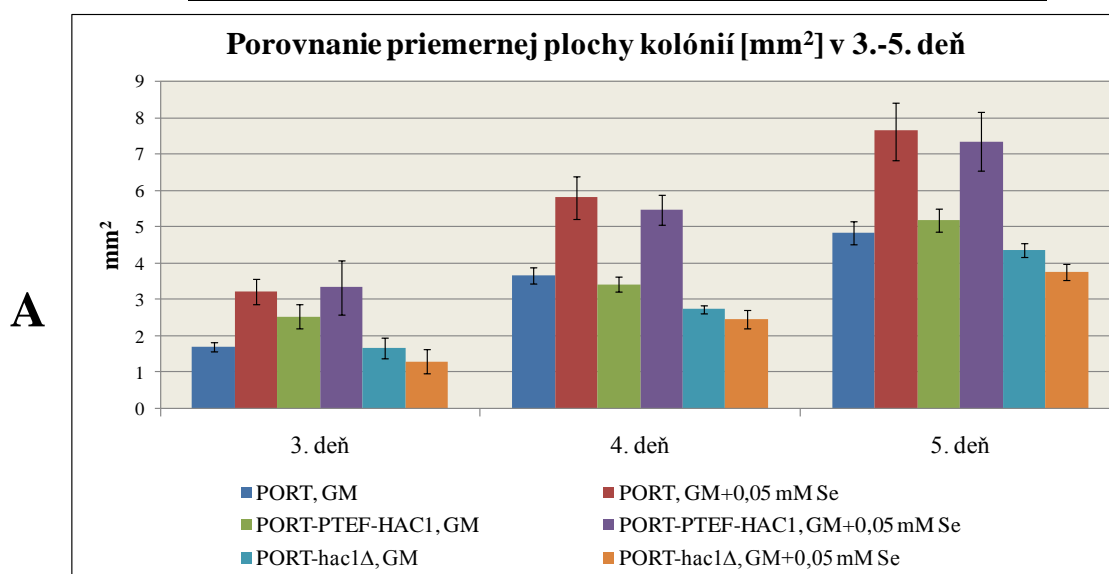
D	Priemerný počet kolónií na platni, GM+0,05 mM Se						
		3. deň	4. deň	5. deň	7. deň	10. deň	12. deň
	PORT	45,5	51,2	51,4	54,3	50,2	39,8
	PORT-P _{TEF} -HACI	42,4	40,6	41,8	34,3	38	36,1
	PORT-hac1Δ	49,3	48,2	46,9	43	48,1	43,5

E	t-test 4. deň, GM	Plocha kolónií	Hmotnosť kolónií	Hmotnosť kolónií na jedn. plochy
	PORT vs. PORT-P _{TEF} -HACI	4,227E-01	2,239E-01	1,065E-01
	PORT vs. PORT-hac1Δ	1,867E-02 *	8,245E-04 **	1,077E-03 *

F	t-test 5. deň, GM+0,05 mM Se	Plocha kolónií	Hmotnosť kolónií	Hmotnosť kolónií na jedn. plochy
	PORT vs. PORT-P _{TEF} -HACI	2,206E-01	3,022E-01	4,009E-01
	PORT vs. PORT-hac1Δ	1,550E-07 **	9,153E-04 **	2,997E-03 *

Tab. 20. Detailné informácie zo vzájomne nezávislých rastových analýz kmeňov *S. cerevisiae* a ich štatistická analýza. **A, B** - Počet zozbieraných kolónií a hmotnosť biomasy kolónií kmeňov počas rastových analýz. **C, D** - Porovnanie priemerného počtu kolónií na miske v daný deň na GM a GM+0,05 mM Se. **E, F** - Preukázanie štatistickej významnosti pomocou t-testu.

Rastová analýza pri súčasnom výseve na GM a GM+0,05 mM Se



Obr. 23. Rastová analýza pri súčasnom výseve kmeňov *S. cerevisiae* odvodených od kmeňa PORT na GM a GM+0,05 mM Se sledovaná počas 3.-5. dňa vývoja. **A** - Vzájomné porovnanie plochy kolónií kmeňov na GM a GM+0,05 mM Se. **B** - Porovnanie hmotností kolónií týchto kmeňov na GM a GM+0,05 mM Se v 5. deň rastovej analýzy. **C** - Porovnanie hmotností kolónií na jednotku plochy na GM a GM+0,05 mM Se počas 5. dňa rastovej analýzy. Biomasa bola odoberaná iba v 5. deň.

A	Rastová analýza pri súčasnom výseve kmeňov			
	Počet zozbieraných kolónií / hmotnosť biomasy [g]			
	5. deň	PORT	PORT-P_{TEF}-HACI	PORT-hacIΔ
	GM	483 / 0,588	333 / 0,429	390 / 0,382
B	GM+0,05 mM Se	463 / 1,065	376 / 0,821	422 / 0,339
	Rastová analýza pri súčasnom výseve kmeňov			
	Priemerný počet kolónií na platni			
	GM	3. deň	4. deň	5. deň
	PORT	52	50	53,7
	PORT-P _{TEF} -HACI	35,3	35,7	37
	PORT-hacIΔ	43	44,7	43,3
	GM+0,05 mM Se			
	PORT	45,5	51,2	51,4
	PORT-P _{TEF} -HACI	42,4	40,6	41,8
	PORT-hacIΔ	49,3	48,2	46,9
C	t-test- v rámci rastovej analýzy pri súčasnom výseve kmeňov na GM a 0,05 mM Se			
		Plocha kolónií	Hmotnosť kolónií	Hmotnosť kolónií na jedn. plochy
	5. deň, GM			
	PORT vs. PORT-P _{TEF} -HACI	5,309E-02	2,185E-01	3,789E-01
	PORT vs. PORT-hacIΔ	2,890E-03 *	2,738E-02 *	6,261E-02
	5. deň, GM+0,05 mM Se			
	PORT vs. PORT-P _{TEF} -HACI	2,206E-01	3,022E-01	4,009E-01
	PORT vs. PORT-hacIΔ	1,550E-07 **	9,153E-04 **	2,997E-03 *
	5. deň, GM vs. GM+0,05 mM Se			
	PORT	3,803E-06 **	3,105E-04 **	3,992E-03 *
	PORT-P _{TEF} -HACI	6,033E-05 **	2,952E-02 *	1,946E-02 *
	hacIΔ	1,168E-04 **	6,522E-03 *	1,704E-01

Tab. 21. Detailné informácie o rastovej analýze pri súčasnom výseve kmeňov *S. cerevisiae* a ich štatistická analýza. A - Počet zozbieraných kolónií a hmotnosť biomasy kolónií kmeňov počas rastovej analýzy. **B** - Porovnanie priemerného počtu kolónií na miske v daný deň na GM a GM+0,05 mM Se. **C** - Preukázanie štatistickej významnosti pomocou t-testu.

5.4.3 Porovnanie morfológie buniek a intenzity signálu Sec61p-GFP pomocou mikroskopu

Cieľ: V čase porovnať morfológiu buniek a intenzitu fluorescenčného signálu Sec61p-GFP u kmeňov s deléciou a konštitutívnou expresiou génu *HAC1* s rodičovským kmeňom PORT na GM a GM+0,05 mM Se.

Rodičovský kmeň PORT tvorí na GM guľovité a oválne bunky, pri kultivácii na GM+0,05 mM Se vytvára predĺžené bunky, ktoré sú často asociované v zhlukoch (Obr. 24A, C). Kmeň s deléciou génu *HAC1* vytvára guľovité a oválne bunky na GM i na médiu so selénanom, čím sa líši od kmeňa PORT (Obr. 24A, C). Kmeň so zvýšenou expresiou génu *HAC1* mal morfológiu buniek porovnateľnú s kmeňom PORT na oboch typoch médií (Obr. 25A, C). Tvar buniek sa u kmeňov s deléciou a zvýšenou expresiou génu *HAC1* v čase (3., 5., 10. deň) nemenil. Podobne ako kmeň PORT i tieto kmene intenzívne sporulujú. Počet sporulujúcich buniek stúpa v čase – v 10. deň vývoja už sporuluje veľká časť bunkovej populácie bez ohľadu na to, či sú kultivované na GM alebo na médiu so selénanom.

Pre kmene s deléciou a zvýšenou expresiou génu *HAC1* som pripravila ich varianty s C-terminálnou fúziou Sec61p s GFP (postup prípravy na Obr. 18). U každého takto pripraveného kmeňa bola overená zhoda v morfológii kolónií i buniek porovnaním s príslušným neznačeným kmeňom, pričom nedošlo k žiadnym zmenám a fúzia Sec61p s GFP nemala na morfogénzu a tvar buniek žiaden vplyv.

U kmeňov s deléciou a zvýšenou expresiou génu *HAC1* s fúziou Sec61p s GFP som porovnávala intenzitu fluorescenčného signálu Sec61p-GFP v čase. Ku zmenám intenzity fluorescenčného signálu Sec61p-GFP nedochádzalo ani medzi kmeňmi, ani v závislosti od typu kultivačného média (Obr. 24B, D; Obr. 25B, D). Porovnávanie intenzity fluorescenčného signálu Sec61p-GFP bolo počas 10. dňa skomplikované veľkým počtom sporulujúcich buniek, a tým, že spóry významne autofluoreskujú. Autofluorescenčný signál je patrný i u kontrolného, neznačeného kmeňa PORT (vid' Obr. 24A, B – kmeň PORT, 5. deň, spóra označená hviezdikou). Na Obr. 24 a 25 sú vybraté hlavne bunky bez spór, aby mohla byť porovnaná intenzita signálu Sec61p-GFP z ER.

U buniek všetkých kmeňov na oboch typoch médií je však patrný rozdiel v intenzite fluorescencie Sec61p-GFP z ER asociovaného s plazmatickou membránou a perinukleárnym priestorom, pričom silnejší signál bol vždy získaný z ER asociovaného s perinukleárnym priestorom (Obr. 24B, D; Obr. 25B, D).

To bolo potvrdené i na základe analýzy obrázkov z fluorescenčného mikroskopu programom Image J, pomocou ktorého som merala intenzitu signálu z ER asociovaného s plazmatickou membránou a perinukleárnym priestorom.

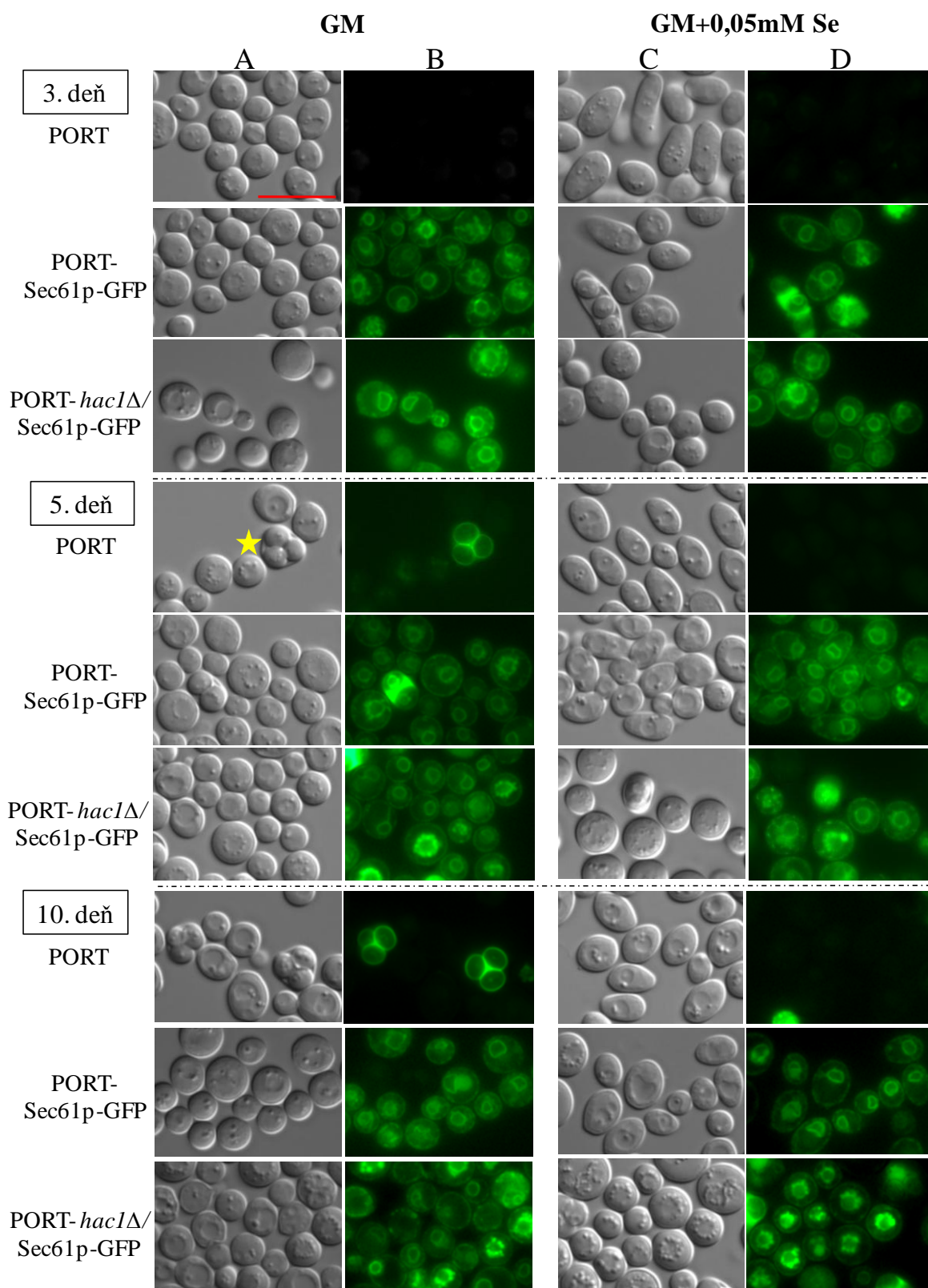
Intenzita signálu získaného z ER asociovaného s perinukleárnym priestorom bola u buniek všetkých kmeňov na oboch typoch médií o 1/4-1/3 vyššia než intenzita signálu získaná z ER asociovaného s plazmatickou membránou (Tab. 22). Hodnoty intenzity fluorescenčného signálu sú vzájomne porovnateľné medzi jednotlivými kmeňmi, dňami a typmi kultivačných médií.

Každý vyhodnocovaný obrázok z fluorescenčného mikroskopu bol získaný z nového bunkového preparátu. Každá hodnota je priemerom z merania signálu z 15-20 náhodne vybraných buniek. Toto meranie má iba orientačný charakter, pretože vnútorný fluorescenčný štandard mikroskopu, cez ktorý sa kalibrujú premenné, sa v rámci jednotlivých meraní a dní môže líšiť. Hodnota intenzity fluorescenčného signálu Sec61p-GFP ďalej závisela i od zaostrenia buniek pri mikroskopickom pozorovaní daného preparátu.

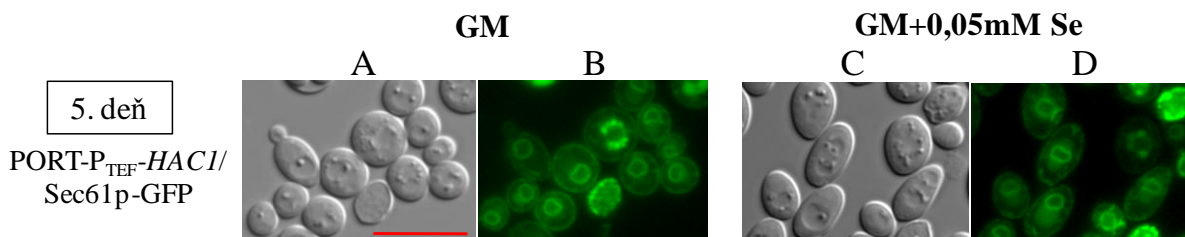
Intenzita fluorescenčného signálu Sec61p-GFP z ER asociovaného s plazmatickou membránou [relatívne jednotky]						
Kmeň	PORT-Sec61p-GFP		PORT-P _{TEF} -HAC1/ Sec61p-GFP		PORT-hac1Δ/ Sec61p-GFP	
Médium	GM	GM+0,05 mM Se	GM	GM+0,05 mM Se	GM	GM+0,05 mM Se
3. deň	61,74 ± 6,03	62,00 ± 7,50	66,64 ± 6,62	63,88 ± 6,68	59,93 ± 6,97	61,49 ± 6,64
5. deň	56,45 ± 7,43	53,19 ± 6,79	49,87 ± 7,25	48,16 ± 6,56	48,02 ± 6,58	59,90 ± 9,19
10. deň	56,16 ± 6,65	50,47 ± 6,84	46,62 ± 6,62	53,59 ± 6,56	60,38 ± 7,86	41,24 ± 4,65

Intenzita fluorescenčného signálu Sec61p-GFP z ER asociovaného s perinukleárnym priestorom [relatívne jednotky]						
Kmeň	PORT-Sec61p-GFP		PORT-P _{TEF} -HAC1/ Sec61p-GFP		PORT-hac1Δ/ Sec61p-GFP	
Médium	GM	GM+0,05 mM Se	GM	GM+0,05 mM Se	GM	GM+0,05 mM Se
3. deň	82,96 ± 6,37	91,90 ± 8,33	90,29 ± 7,60	86,80 ± 6,80	89,77 ± 7,83	89,31 ± 7,21
5. deň	91,68 ± 10,80	84,79 ± 7,94	77,33 ± 6,89	80,24 ± 8,75	76,85 ± 8,81	91,87 ± 9,35
10. deň	85,14 ± 8,62	82,90 ± 7,95	77,78 ± 7,68	79,22 ± 6,36	105,65 ± 14,63	97,37 ± 16,14

Tab. 22. Porovnanie hodnôt intenzity fluorescenčného signálu Sec61p-GFP u kmeňov *S. cerevisiae* s fúziou Sec61p s GFP v čase na GM a GM+0,05 mM Se pomocou programu Image J. Vzájomne bola porovnávaná intenzita fluorescenčného signálu Sec61p-GFP z ER asociovaného s plazmatickou membránou a perinukleárnym priestorom. Každá hodnota je priemerom z meraní 15-20 buniek. Toto meranie má iba orientačný charakter.



Obr. 24. Porovnanie morfológie buniek a intenzity fluorescenčného signálu Sec61p-GFP v čase u kmeňov *S. cerevisiae* s fúziou Sec61p-GFP s neznačeným kmeňom PORT na GM a GM+0,05 mM Se. Intenzita fluorescencie Sec61p-GFP bola snímaná pri 3 s. Žltou hviezdikou je označená sporulujúca bunka u neznačeného kmeňa PORT so silným autofluorescenčným signálom z povrchu spór. Červená mierka v pravom dolnom rohu prvého obrázka zodpovedá 10 μ m; zväčšenie je u všetkých obrázkov rovnaké.



Obr. 25. Morfológia buniek a intenzita fluorescenčného signálu Sec61p-GFP u 5 dní starých buniek kmeňa *S. cerevisiae* PORT-P_{TEF}-HAC1/ Sec61p-GFP na GM a GM+0,05 mM Se. Intenzita fluorescencie Sec61p-GFP bola snímaná pri 3 s. Červená mierka v pravom dolnom rohu prvého obrázka zodpovedá 10 μ m; zväčšenie je u všetkých obrázkov rovnaké.

5.4.4 Porovnanie intenzity signálu Sec61p-GFP pomocou spektrofleurimetra

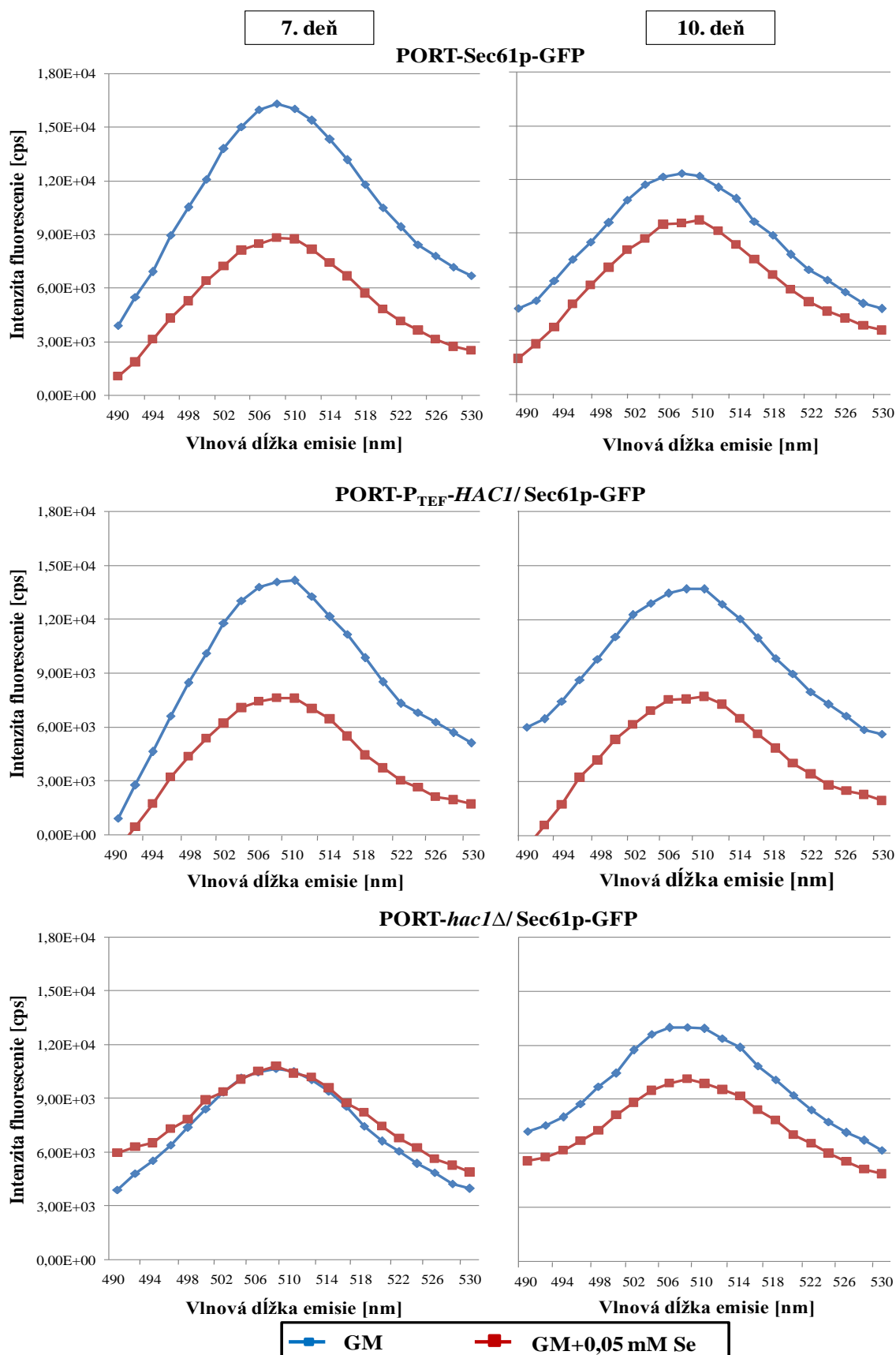
Cieľ: Porovnať intenzitu fluorescenčného signálu Sec61p-GFP u kolónií kmeňa PORT-Sec61p-GFP a kmeňov s deléciou a konštitutívnou expresiou génu HAC1 s fúziou Sec61p s GFP v čase *in situ* pomocou spektrofleurimetra externou sondou za neselektívnych podmienok a po pôsobení DTT (Metóda 4.2.4.8).

Časový vývoj fluorescencie (7.-10. deň) sa u monokolónií kmeňa PORT-Sec61p-GFP a kmeňa s konštitutívnou expresiou génu HAC1 líšil od kmeňa s deléciou génu HAC1 na GM i GM+0,05 mM Se (Obr. 26).

U kmeňov PORT-Sec61p-GFP a PORT-P_{TEF}-HAC1/ Sec61p-GFP sa preukázal štatisticky významný rozdiel v intenzite fluorescenčného signálu nameraný z GM v porovnaní s meraním z GM+0,05 mM Se (t-test - Tab. 23B). Hodnota intenzity fluorescencie vrásčitých monokolónií týchto kmeňov bola nižšia na GM+0,05 mM Se (Obr. 26, Tab. 23A).

To neplatilo pre hladké kolónie kmeňa PORT-hac1 Δ / Sec61p-GFP, u ktorých bola intenzita fluorescencie porovnateľná na GM i na médiu so selénanom (Obr. 26, Tab. 23). Hodnota intenzity fluorescencie nameraná pomocou externej sondy spektrofleurimetra je tak pravdepodobne podmienená morfológiou kolónií (hladká/vrásčitá) a priemernou plochou kolónií.

V tab. 23A sú uvedené maximálne hodnoty fluorescenčného signálu Sec61p-GFP namerané pri 508 nm. Každá hodnota v obr. 26 a tab. 23A je priemerom z meraní 6-9 monokolónií. Pri vyhodnocovaní meraní som od intenzity fluorescencie každého značeného kmeňa odpočítavala hodnoty intenzity autofluorescencie neznačeného kmeňa toho istého genotypu, veku a rastúceho na rovnakom type média. Toto meranie bolo zopakované 4× s obdobnými výsledkami.



Obr. 26. Porovnanie intenzity fluorescenčného signálu Sec61p-GFP u kmeňov *S. cerevisiae* s fúziou Sec61p-GFP na GM a GM+0,05 mM počas 7. a 10. dňa vývoja monokolónii. Intenzita signálu bola snímaná *in situ* pomocou externej sondy spektrofluorimetra. Každá krivka je priemerom z meraní 6-9 monokolónii.

A

Intenzita fluorescenčného signálu Sec61p-GFP v maxime pri 508 nm [cps]						
Kmeň	PORT-Sec61p-GFP		PORT-P _{TEF} -HAC1/ Sec61p-GFP		PORT-hac1Δ / Sec61p-GFP	
	hodnota	smer. odch.	hodnota	smer. odch.	hodnota	smer. odch.
Médium	7. deň		7. deň		7. deň	
GM	1,63E+04	1,41E+03	1,41E+04	4,92E+02	1,07E+04	1,36E+02
GM+0,05 mM Se	8,80E+03	2,26E+03	7,61E+03	2,17E+03	1,08E+04	2,38E+01
	10. deň		10. deň		10. deň	
GM	1,24E+04	1,52E+03	1,37E+04	1,81E+03	1,30E+04	1,08E+03
GM+0,05 mM Se	9,57E+03	5,42E+02	7,57E+03	5,51E+02	1,01E+04	3,00E+02

B

t-test	7. deň	10. deň
GM		
PORT vs. PORT-P _{TEF} -HAC1	6,137E-02	3,822E-01
PORT vs. PORT-hac1Δ	2,165E-02 *	4,811E-01
GM+0,05 mM Se		
PORT vs. PORT-P _{TEF} -HAC1	1,818E-01	1,438E-01
PORT vs. PORT-hac1Δ	6,397E-02	3,440E-01
GM vs. GM+0,05 mM Se		
PORT	9,425E-03 *	1,383E-02 *
PORT-P _{TEF} -HAC1	2,114E-03 *	4,000E-03 *
hac1Δ	4,645E-01	7,724E-02

Tab. 23. Informácie z merania intenzity fluorescenčného signálu Sec61p-GFP u kmeňov *S. cerevisiae* s fúziou Sec61p-GFP na GM a GM+0,05 mM počas 7. a 10. dňa vývoja monokolónií a ich štatistická analýza. **A** – Maximálne hodnoty fluorescenčného signálu Sec61p-GFP namerané pri 508 nm. **B** – Preukázanie štatistickej významnosti pomocou t-testu. Každá hodnota je priemerom z meraní 6-9 monokolónií.

5.4.4.1 Stanovenie intenzity fluorescence Sec61p-GFP po pôsobení DTT

Tri dni staré makrokolónie kmeňov PORT-Sec61p-GFP, PORT-P_{TEF}-*HAC1*/ Sec61p-GFP a PORT-*hac1Δ*/ Sec61p-GFP som použila na sledovanie stresovej odpovede v ER vyvolanej DTT v gradientovom usporiadaní pomocou merania intenzity fluorescence Sec61p-GFP (Metóda 4.2.4.8).

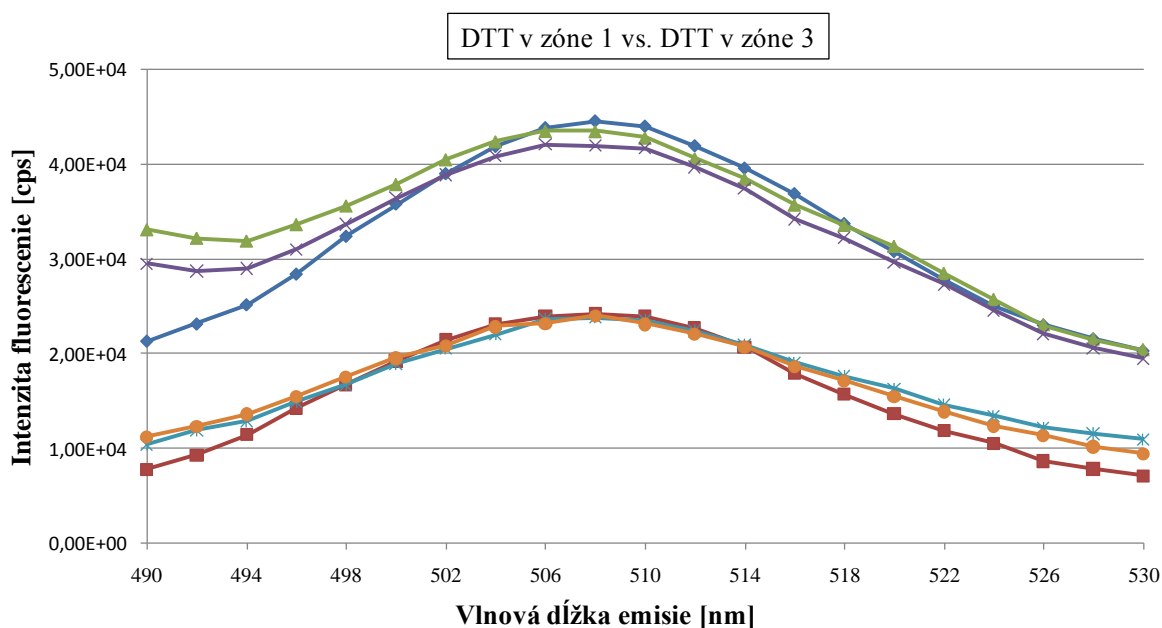
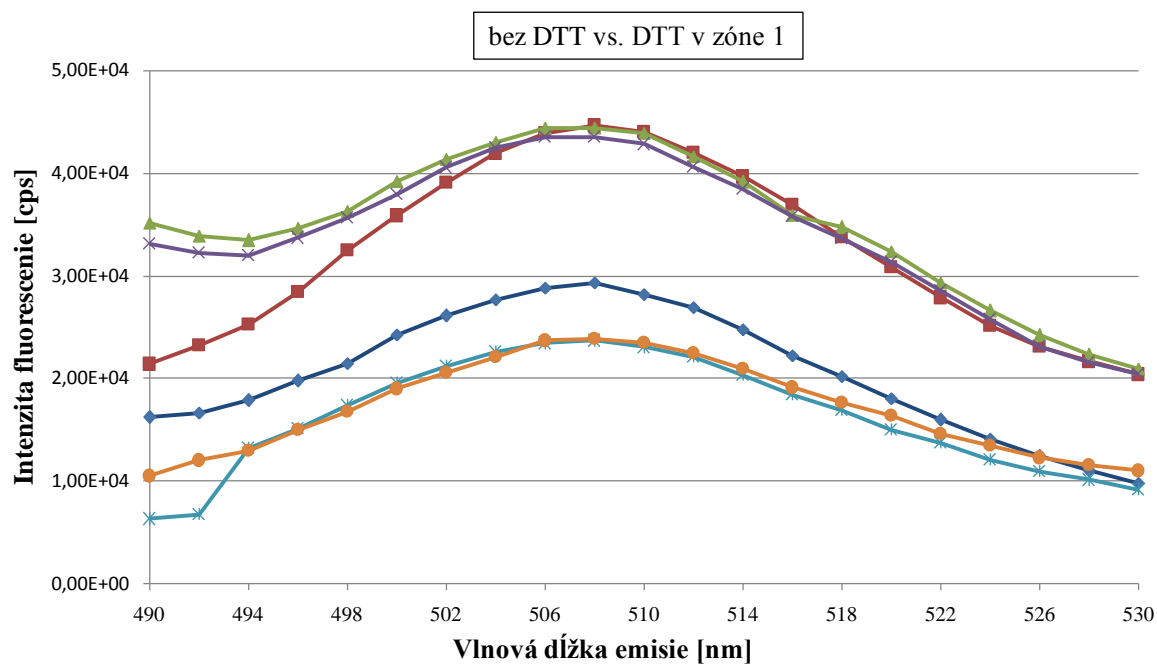
DTT chemicky indukuje UPR zmenou redoxného stavu v lumene ER, čím narušuje tvorbu disulfidických väzieb v proteínoch a spôsobuje defekt v ich štruktúre. Intenzitu fluorescence som snímala 15 hodín po pridaní 150 µl 0,4 M DTT (Petriho miska ø 90 mm, 20-25 ml GM v miske) k 3 dni starým makrokolóniám.

U rodičovského kmeňa PORT-Sec61p-GFP došlo po indukcii DTT v zóne 1 (najbližšia ku zdroju DTT) ku zvýšeniu intenzity fluorescenčného signálu o 52 % (Obr. 27, t-test Tab. 24B). Rozdiel bol štatisticky významný. Kmene s deléciou a zvýšenou expresiou génu *HAC1* na pridanie DTT nereagovali.

U kmeňa s deléciou génu *HAC1* nedošlo v prítomnosti DTT k zvýšeniu intenzity fluorescence. Intenzita jeho signálu Sec61p-GFP bola na úrovni intenzity signálu značeného rodičovského kmeňa bez indukcie UPR (Obr. 27).

U kmeňa PORT-P_{TEF}-*HAC1* bola i za neindukčných podmienok zvýšená hladina DTT a po pridaní DTT k ďalšiemu zvýšeniu nedošlo (Obr. 27). Tento výsledok je skôr prekvapivý a naznačuje zvýšenie hladiny Hac1p za nestresových podmienok. Hoci bolo toto meranie zopakované 2× s obdobnými výsledkami, experiment by bolo nutné ešte zopakovať.

V tab. 24A sú uvedené maximálne hodnoty fluorescenčného signálu Sec61p-GFP namerané pri 508 nm. Každá hodnota v obr. 27 a tab. 24A je priemerom z meraní troch makrokolónií. Tab. 24B poukazuje na štatisticky významné rozdiely v intenzite fluorescence makrokolónií meranej v zóne 1 a zóne 3 pôsobenia koncentračného gradientu DTT. Pri vyhodnocovaní meraní som od intenzity fluorescence každého značeného kmeňa odpočítavala hodnoty intenzity autofluorescence neznačeného kmeňa toho istého genotypu za rovnakých experimentálnych podmienok – v ne/prítomnosti induktora UPR.



Obr. 27. Porovnanie intenzity fluorescenčného signálu Sec61p-GFP u 3 dni starých makrokolónií kmeňov *S. cerevisiae* po 15 h pôsobenia koncentračného gradientu 150 μ l 0,4 M DTT. Intenzita signálu bola snímaná *in situ* pomocou externej sondy spektrofotometra Zóna 1 predstavuje makrokolóniu najbližšie ku zdroju DTT, zóna 3 je najvzdialenejšia makrokolónia od zdroja DTT. Každá hodnota je priemerom z meraní 3 makrokolónií pre každú zónu.

Intenzita fluorescenčného signálu Sec61p-GFP v maxime pri 508 nm [cps]						
Kmeň	bez DTT		DTT v zóne 1		DTT v zóne 3	
	hodnota	smer. odch.	hodnota	smer. odch.	hodnota	smer. odch.
PORT-Sec61p-GFP	2,93E+04	1,82E+03	4,46E+04	4,36E+03	2,43E+04	5,06E+03
PORT-P _{TEF} -HAC1/ Sec61p-GFP	4,44E+04	-8,28E+02	4,35E+04	5,32E+03	4,21E+04	3,87E+03
PORT-hac1Δ/ Sec61p-GFP	2,37E+04	2,93E+03	2,39E+04	3,50E+02	2,40E+04	1,47E+02

t-test		
DTT v zóne 1 vs. DTT v zóne 3		
PORT	3,062E-03	*
PORT-hac1Δ	3,652E-01	
DTT v zóne 1		
PORT vs. PORT-hac1Δ	1,823E-02	*
DTT v zóne 3		
PORT vs. PORT-hac1Δ	4,819E-01	

Tab. 24. Informácie z merania intenzity fluorescenčného signálu Sec61p-GFP u 3 dni starých makrokolónií kmeňov *S. cerevisiae* po 15 h pôsobenia koncentračného gradientu 150 μ l 0,4 M DTT a ich štatistická analýza. A – Maximálne hodnoty fluorescenčného signálu Sec61p-GFP namerané pri 508 nm. **B** - Preukázanie štatistickej významnosti pomocou t-testu. Zóna 1 predstavuje makrokolóniu najbližšie ku zdroju DTT, zóna 3 je najvzdialenejšia makrokolónia od zdroja DTT. Každá hodnota je priemerom z meraní 3 makrokolónií pre každú zónu.

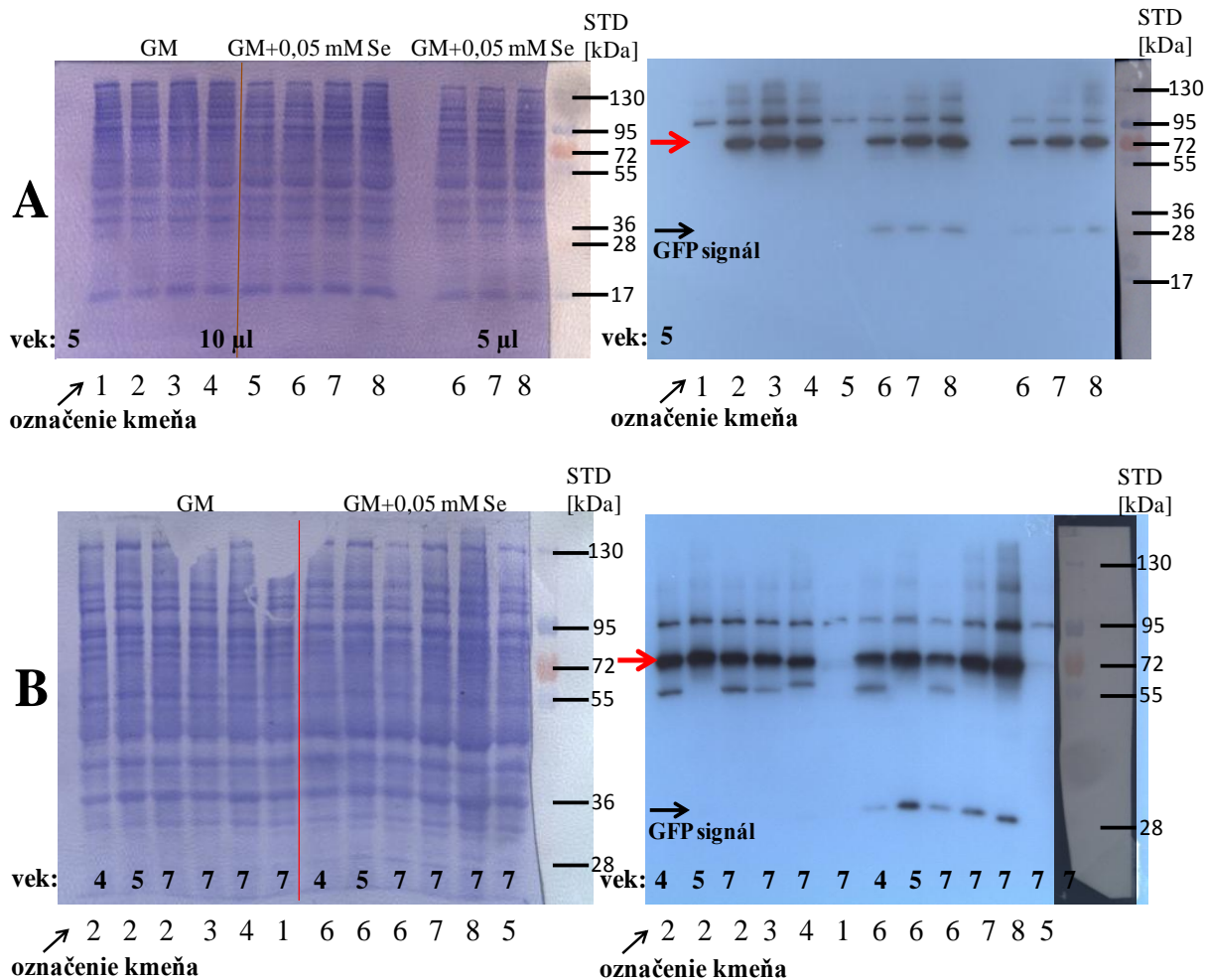
5.4.5 Porovnanie hladiny Sec61p-GFP pomocou imunodetekcie

Cieľ: Pomocou imunodetekcie porovnať hladinu Sec61p-GFP v lyzátoch intracelulárnych proteínov kmeňov s fúziou Sec61p s GFP získaných z GM a GM+0,05 mM Se v rôznych časoch (Metóda 4.2.5).

Pri sledovaní fluorescence Sec61p-GFP u kmeňov PORT, PORT-P_{TEF}-HAC1 a PORT-hac1Δ s fúziou Sec61p s GFP som pomocou fluorescenčného mikroskopu nepozorovala rozdiely medzi kmeňmi, v čase a pri odlišných kultivačných podmienkach (kap. 5.4.3). Meranie intenzity fluorescence Sec61p-GFP pomocou spektrofluorimetra však štatistické významné rozdiely ukázalo (kap. 5.4.4). Preto som sa rozhodla u týchto kmeňov získaných z GM a GM+0,05 mM Se porovnať hladinu Sec61p-GFP v rôznych časoch pomocou imunodetekcie z lyzátoch intracelulárnych proteínov.

Výsledky preukázali, že hladina Sec61p-GFP sa medzi kmeňmi, v čase a pri rôznych kultivačných podmienkach nemení (Obr. 28).

Ako som už spomínala, rozdiely pri meraniach pomocou externej sondy spektrofluorimetra sú pravdepodobne spôsobené rozdielmi v morfortypoch a odlišným vertikálnym a horizontálnym charakterom rastu monokolónií jednotlivých kmeňov na rôznych médiách.



Kmene a ich označenie:

1	PORT, GM	5	PORT, GM+0,05 mM Se
2	PORT-Sec61-GFP, GM	6	PORT-Sec61-GFP, GM+0,05 mM Se
3	PORT-P _{TEF} -HAC1 / Sec61p-GFP, GM	7	PORT-P _{TEF} -HAC1 / Sec61p-GFP, GM+0,05 mM Se
4	PORT-hac1Δ / Sec61p-GFP, GM	8	PORT-hac1Δ / Sec61p-GFP, GM+0,05 mM Se

Obr. 28. Porovnanie hladiny proteínu Sec61p z proteínových lyzátov kmeňov *S. cerevisiae* s fúziou Sec61p-GFP získaných z GM a GM+0,05 mM Se v čase pomocou imunodetekcie. A – Western blot a imunodetekcia z proteínových lyzátov kolónií starých 5 dní, B – Western blot a imunodetekcia z proteínových lyzátov získaných z rôzne starých kolónií (vek uvedený v obrázku).

Naľavo membrána s proteínmi ofarbená po elektroforetickom rozdelení pomocou Coomassie Brilliant Blue. Napravo membrána po imunodetekcii a expozícii na film. Červená šípka na filmoch smeruje na signál vzniknutý po väzbe anti-GFP protilátky na sledovaný proteín Sec61p-GFP. V obrázku označený aj GFP signál. Molekulová hmotnosť Sec61p je 52,9 kDa, molekulová hmotnosť GFP je 26,9 kDa.

5.4.6 Porovnanie zloženia intracelulárnych proteínov pomocou farbenia striebrom

Cieľ: Porovnať zloženie intracelulárnych proteínov rodičovského kmeňa PORT a kmeňov s deléciou a konštitutívnou expresiou génu *HAC1* z proteínových lyzátov získaných z GM a GM+0,05 mM Se v rôznych časoch pomocou farbenia striebrom (Metóda 4.2.5.7).

Pri kontrole správnosti nanášky proteínov na PVDF membráne po elektroforetickom rozdelení a farbení pomocou Coomassie Brilliant Blue sme si všimli, že niektoré „prúžky“ proteínov s rovnakou molekulovou hmotnosťou z lyzátov z GM a GM+0,05 mM Se sa líšia svojou koncentráciou.

Pomocou farbenia striebrom som sa rozhodla porovnať zloženie intracelulárnych proteínov rodičovského kmeňa PORT a kmeňov s deléciou a konštitutívnou expresiou génu *HAC1*. Použila som proteínové extrakty kmeňov získané z GM a GM+0,05 mM Se v rôznych časoch (4., 5., 7. deň).

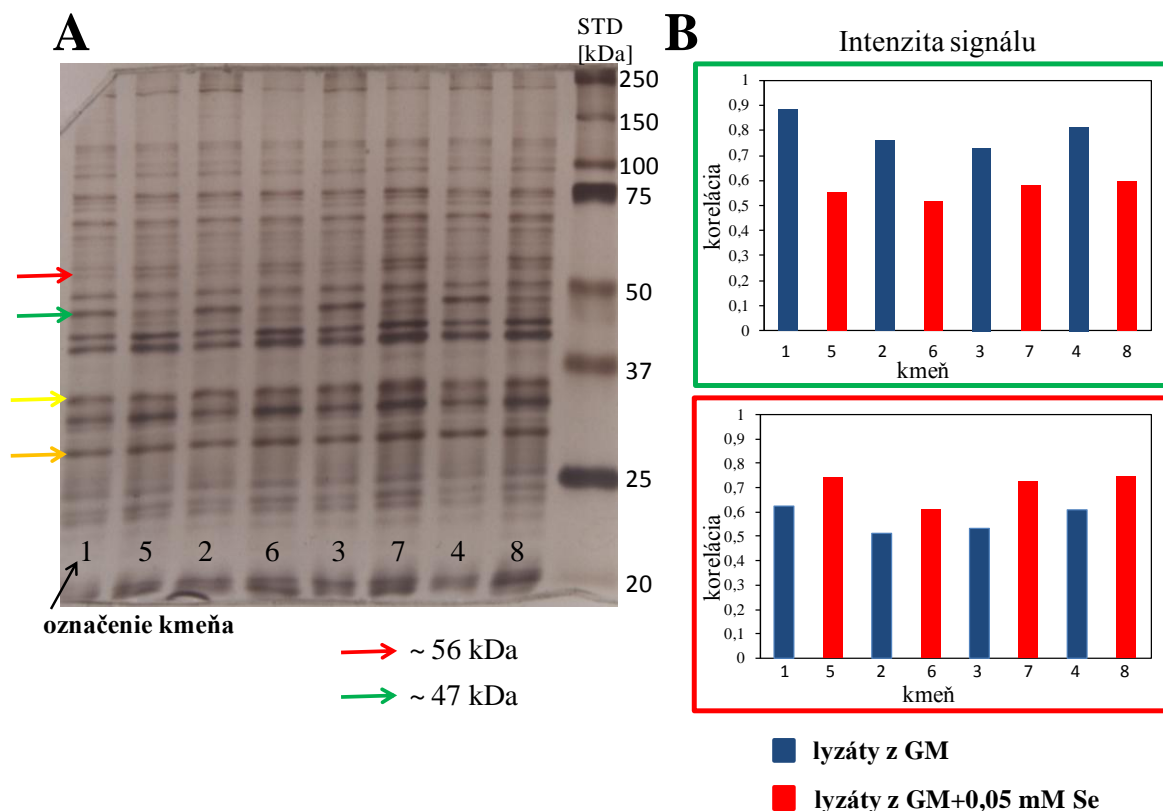
Výsledky preukázali odlišné zloženie intracelulárnych proteínov získaných z lyzátov z GM a GM+0,05 mM Se (Obr. 29A). Kmene sa vzájomne svojím proteínovým zložením nelíšili, rozdiel bol podmienený typom kultivačného média.

Oblasť s odlišným proteínovým zložením je niekoľko (viď Obr. 29A). Na obr. 29A zelená šípka poukazuje na oblasť s molekulovou hmotnosťou ~ 47 kDa s vyššou koncentráciou proteínov z frakcií získaných z GM. Červená šípka poukazuje na oblasť s molekulovou hmotnosťou ~ 56 kDa s vyššou koncentráciou proteínov z frakcií získaných z GM+0,05 mM Se.

Tieto rozdiely som potvrdila i pomocou porovnávania intenzít signálov v programe Image J (Obr. 29B). Pri meraní som si najprv zvolila oblasť s rovnakým proteínovým zložením u všetkých kmeňov a na oboch typoch médií, teda s rovnakou intenzitou signálu (na Obr. 29A označené žltou a oranžovou šípkou). Hodnoty intenzity signálu z oblastí s odlišným zložením intracelulárnych proteínov som normalizovala (Obr. 29B). Normalizáciou rozumieme odstránenie efektu odlišnej nanášky medzi kmeňmi.

Rozdiely v zložení intracelulárnych proteínov boli porovnateľné u frakcií získaných z rôznych časov (4., 5., 7. deň) (dáta nie sú uvedené, na Obr. 29A výsledky pre 5. deň).

Tieto rozdiely v zložení intracelulárnych proteínov v závislosti na type kultivačného média plánujeme ďalej analyzovať. Výsledok môže prispieť ku odhaleniu mechanizmu pôsobenia selénanu sodného na morfogénu kvasinkových kolónií.



Kmene a ich označenie:

1	PORT, GM	5	PORT, GM+0,05 mM Se
2	PORT-Sec61-GFP, GM	6	PORT-Sec61-GFP, GM+0,05 mM Se
3	PORT-P _{TEF} -HAC1 / Sec61p-GFP, GM	7	PORT-P _{TEF} -HAC1 / Sec61p-GFP, GM+0,05 mM Se
4	PORT-hac1Δ / Sec61p-GFP, GM	8	PORT-hac1Δ / Sec61p-GFP, GM+0,05 mM Se

Obr. 29. Porovnanie zloženia intracelulárnych proteínov kmeňov *S. cerevisiae* odvodených od kmeňa PORT kultivovaných na GM a GM+0,05 mM Se po elektroforetickom rozdelení a farbení striebrom. Proteínové frakcie boli získané z 5 dní starých monokolónií. **A** - Porovnanie zloženia intracelulárnych proteínov farbením striebrom. Červenou (proteíny ~ 56 kDa) a zelenou (proteíny ~ 47 kDa) šípkou je poukázané na 2 oblasti s odlišným proteínovým zložením na GM a GM+0,05 mM Se. **B** – Vynesenie intenzity signálu proteínov s molekulovou hmotnosťou ~ 47 kDa (graf ohraničený zelenou) a ~ 56 kDa (graf ohraničený červenou) po normalizácii. Oblasti označené žltou a oranžovou šípkou boli použité ako základ pre normalizáciu a ich intenzita sa nemení v závislosti na type média. Vyhodnotené pomocou programu Image J.

U kmeňov s deléciou a konštitutívnou expresiou génu *HAC1* som ďalej testovala ich citlivosť voči rôznym typom inhibítorov. Výsledky sú uvedené v kap. 5.6.

5.5 Analýza kmeňov s deléciou a zvýšenou expresiou génu *HAC1* odvodených od kmeňa BR-F-Flo11p-GFP

5.5.1 Morfologické charakteristiky kolónií kmeňov s deléciou a zvýšenou expresiou *HAC1* odvodených od kmeňa BR-F-Flo11p-GFP

Cieľ: Morfologicky charakterizovať kmene s deléciou a konštitutívnou expresiou génu *HAC1* pod kontrolou promótoru *TEF* odvodené od kmeňa BR-F-Flo11p-GFP na GM.

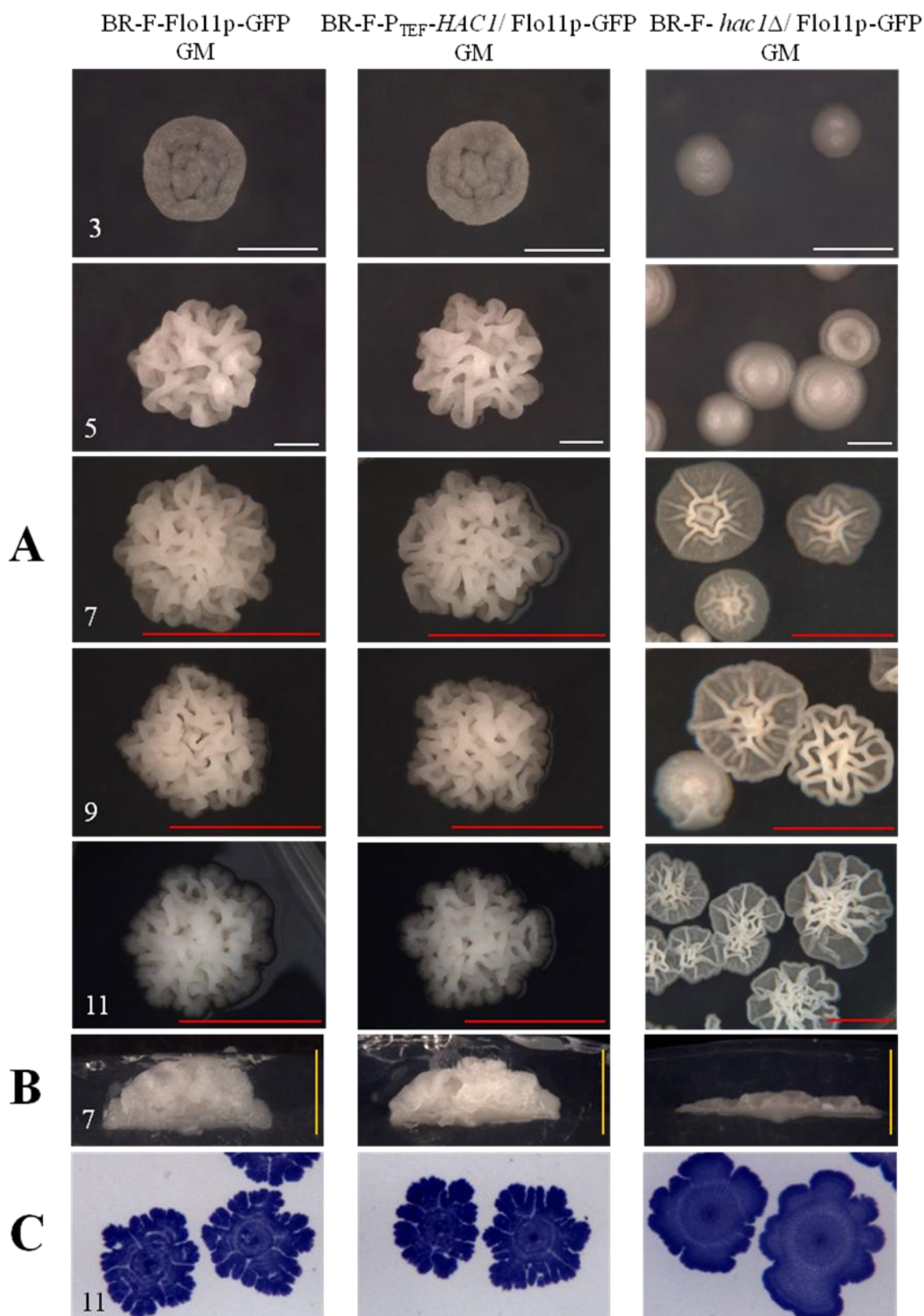
Kmene s deléciou génu *HAC1* odvodené od prírodného kmeňa PORT stratili schopnosť vytvárať vrásčité kolónie na GM+0,05 mM Se, ich kolónie ostali hladké. Zaujímalo nás, či dôjde ku zmene morfortypu aj u ďalšieho prírodného kmeňa *S. cerevisiae* BR-F-Flo11p-GFP, ktorý vytvára pri raste na GM štruktúrované, vrásčité kolónie. U kmeňov odvodených od kmeňa BR-F-Flo11p-GFP sme vplyv 0,05 mM selénanu na morfogenézu nesledovali, pretože tvorba vrásčitého fenotypu je indukovaná už na médiu s 3% glycerolom.

Kolónie kmeňov s deléciou génu *HAC1* odvodené od kmeňa BR-F-Flo11p-GFP sú hladké až polovrásčité, nerastú vo vertikálnom rozmere ako rodičovský kmeň, ktorého kolónie rastú horizontálne na menšej ploche a vertikálne sú vyššie (Obr. 30A, B). Úroveň vertikálneho rastu kolónií som porovnávala 7. deň vývoja kolónií (Metóda 4.2.4.4, Obr. 30B).

Charakter ich vrastania do média som porovnávala „modrou stopou“ v 11. deň vývoja kolónií (Metóda 4.2.4.2). Rodičovský kmeň BR-F-Flo11p-GFP má kyticovitý charakter zarastania do GM, podobný kmeňu PORT na GM+0,05 mM Se. Kmeň *hac1Δ* zarastá do GM menej a jeho „modrá stopa“ je menej štruktúrovaná (Obr. 30C).

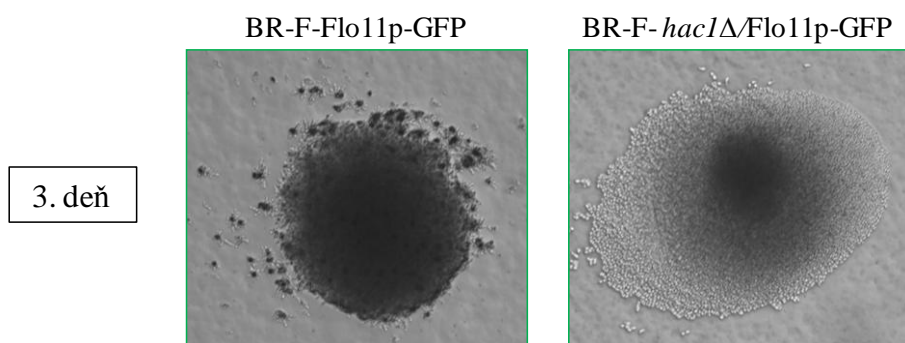
U kmeňov so zvýšenou expresiou génu *HAC1* pod kontrolou promótoru *TEF* sa morfológia klonov na GM, úroveň vertikálneho rastu a charakter vrastania do média v porovnaní s rodičovským kmeňom nezmenili (Obr. 30A, B, C).

Charakter vrastania podpovrchovej časti kolónií do agaru bolo možné určiť aj po odstránení membrány s pórmí (Nucleopore Membrane Circles), na ktorej som kolónie kmeňov kultivovala do 3. dňa vývoja (GM; hustota 200 b./platňa) (Metóda 4.2.4.3). Stopa vytvorená podpovrchovou časťou kolónií kmeňa BR-F-Flo11p-GFP bola výrazne silnejšia než stopa vytvorená kmeňom *hac1Δ*, ktorý do GM zarastal málo (Obr. 31).



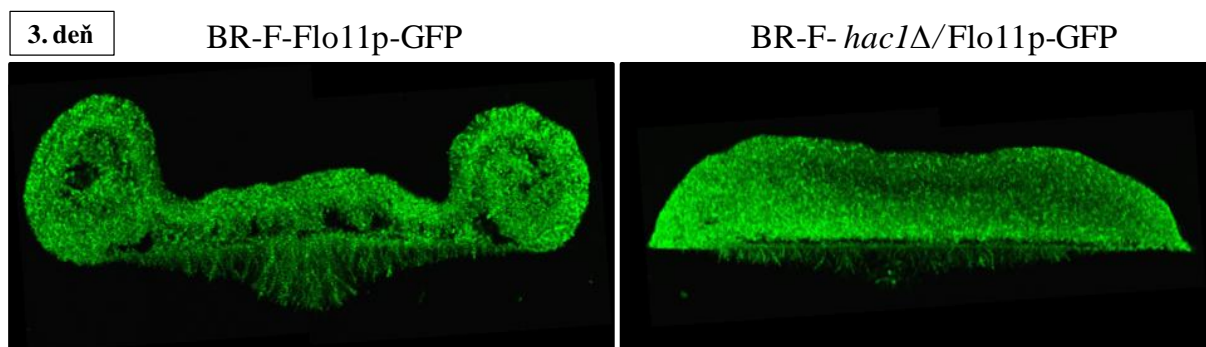
Obr. 30. Morfologické charakteristiky kolónií kmeňov *S. cerevisiae* BR-F-P_{TEF}-*HAC1*/ Flo11p-GFP a BR-F-*hac1*Δ/ Flo11p-GFP v porovnaní s rodičovským kmeňom BR-F- Flo11p-GFP na GM. **A** – morfogenéza kolónií (biela mierka 1 mm, červená mierka 5 mm), **B** – priečny rez kolónie (oranžová mierka 2 mm), **C** – určenie charakteru vrastania kolónií do média pomocou „modrej stopy“. V ľavom dolnom rohu snímky je uvedený vek kolónie v dňoch.

Podpovrchová časť kmeňa BR-F-Flo11p-GFP je na okrajoch tvorená pseudohýfami, ktoré umožňujú pevné vrastanie do média. Okraje podpovrchovej časti kolónií kmeňa *hac1Δ* boli tvorené guľatými a oválnymi bunkami, ku tvorbe pseudohýfálnych vlákien takmer nedochádzalo (Obr. 31).



Obr. 31. Porovnanie stopy kolónie rastúcej na membráne u kmeňa *S. cerevisiae* s deléciou génu *HAC1* v porovnaní s rodičovským kmeňom na GM. Tretí deň po výseve bola membrána s „nadzemnou“ časťou kolónií odstránená. Charakter vrastania kolónií do agaru sa líšil. Pozorované pri celkovom zväčšení 100×.

Architektúra kmeňov BR-F-Flo11p-GFP a *hac1Δ* a charakter ich vrastania do média boli porovnávané i s využitím 2-fotónového konfokálneho mikroskopu po ofarbení Calcofluor White (Obr. 32, foto: PALKOVÁ a VÁCHOVÁ). Centrálna časť 3 dni starých kolónií rodičovského kmeňa začína horizontálne expandovať, vytláča okrajovú časť nahor a kolónia získava tvar šálky. Centrálna spodná časť kolónie vrastá radiálne do agaru tvoriac pseudohýfy podobné korienkom. Z bázy okrajovej časti začínajú vyrastať sekundárne „korienky“ (Obr. 32 naľavo) (bližšie informácie o vývoji kolónií kmeňa BR-F, viď VÁCHOVÁ a kol. 2011). U kmeňa *hac1Δ* k vytláčaniu okrajovej časti nahor nedochádza, korienky sú kratšie, viac homogénne a do agaru vrastajú menej (Obr. 32 napravo).



Obr. 32. Architektúra 3 dni starých kolónií kmeňov *S. cerevisiae* BR-F a BR-F-*hac1Δ*/ Flo11p-GFP na GM. Vertikálne priečne rezy kolónií ofarbené Calcofluor White. Vizualizácia z 2-fotónového konfokálneho mikroskopu. Zväčšenie je u oboch obrázkov rovnaké (foto: PALKOVÁ a VÁCHOVÁ).

5.5.2 Rastová analýza kmeňov s deléciou a zvýšenou expresiou *HAC1* odvodených od kmeňa BR-F-Flo11p-GFP za neselektívnych podmienok

Cieľ: Vykonať rastové analýzy pripravených kmeňov s deléciou a konštitutívnou expresiou génu *HAC1* pod kontrolou promótoru *TEF* odvodených od kmeňa BR-F-Flo11p-GFP na GM a v čase porovnať prírastok v ploche kolónií, hmotnosti kolónií a hmotnosti kolónií na jednotku plochy.

Pri rastovej analýze kmeňov *hac1Δ*, P_{TEF} -*HAC1* a BR-F-Flo11p-GFP na GM sa ukázalo, že v ploche kolónií, hmotnosti kolónií a hmotnosti kolónií na jednotku plochy nie je zásadný rozdiel medzi rodičovským kmeňom a kmeňom so zvýšenou expresiou génu *HAC1* (Obr. 33). Delécia génu *HAC1* výrazne ovplyvnila rast kolónií i za nestresových podmienok.

Kmeň *hac1Δ* tvorí do 5. dňa vývoja prevažne hladké kolónie a vegetatívny rast je spomalený v porovnaní s kmeňmi BR-F-Flo11p-GFP a P_{TEF} -*HAC1*. Od 6.-7. dňa vývoja získavajú kolónie kmeňa *hac1Δ* heterogénny morfolotyp, sú polovrásčité, rastú výrazne do plochy, avšak vo vertikálnom smere k rastu nedochádza.

Priemerná hmotnosť 1 kolónie kmeňa *hac1Δ* bola v 5. deň vývoja v porovnaní s rodičovským kmeňom nižšia 4,6-krát a v 7. deň vývoja nižšia 1,7-krát. V 9. deň bola hmotnosť delečného kmeňa dokonca 1,3-krát vyššia v porovnaní s kmeňom BR-F-Flo11p-GFP. Priemerná hmotnosť kolónií *hac1Δ* na jednotku plochy je však po celú dobu rastovej analýzy podstatne nižšia než u kmeňov BR-F-Flo11p-GFP a P_{TEF} -*HAC1*. To poukazuje na zníženú schopnosť kolónií rásť vertikálnym smerom (Obr. 33). Kmene s vrásčitou morfológiou kolónií rastú viac vertikálne, a preto majú vyššiu hmotnosť na jednotku plochy.

V tab. 25A je uvedené, aký bol celkový počet zozbieraných kolónií a celková hmotnosť biomasy kolónií odvážená počas rastovej analýzy, z ktorých sa následne vypočítavali hodnoty všetkých troch sledovaných parametrov pre príslušný deň (plocha kolónií, hmotnosti kolónií a hmotnosti kolónií na jednotku plochy).

V tab. 25B je uvedené, aký bol priemerný počet kolónií na jednej platni pre daný deň a kmeň. Táto hodnota by mala byť medzi jednotlivými kmeňmi a dňami porovnateľná. Cieľom bolo vysiať 100 buniek/miska. Ako je však zrejmé z tab. 25B, hustota výsevu kmeňov BR-F-Flo11p-GFP a P_{TEF} -*HAC1* bola priemerne 3× vyššia ako hustota výsevu kmeňa *hac1Δ*, a to i napriek určovaniu hustoty bunkovej suspenzie pomocou spektrofotometra i mikroskopicky s využitím Bürkerovej počítacej komôrky. Celkovo nižšia priemerná hustota

výsevu kmeňa *hac1Δ* by mohla výrazne ovplyvniť zvýšenú plochu kolónií u deletanta v neskorších štádiách vývoja (Tab. 25D – t-test rozdielov v počte kolónií).

Nižšia hustota výsevu kmeňa *hac1Δ* môže byť daná zníženou klíčivosťou jeho buniek, ktorá sa preukázala aj pri kvapkových testoch za kontrolných podmienok (GM, 28 °C - viď Obr. 38). Kmene BR-F-Flo11p-GFP a P_{TEF} -*HAC1* sú tvorené zhlukmi buniek (Obr. 34A) a práve ich vysoká schopnosť vzájomne adherovať komplikuje prípravu homogénnej suspenzie buniek určenej na výsev. U kmeňa *hac1Δ* k zhlukovaniu buniek nedochádza, resp. vzájomne adherujú málo (Obr. 34A).

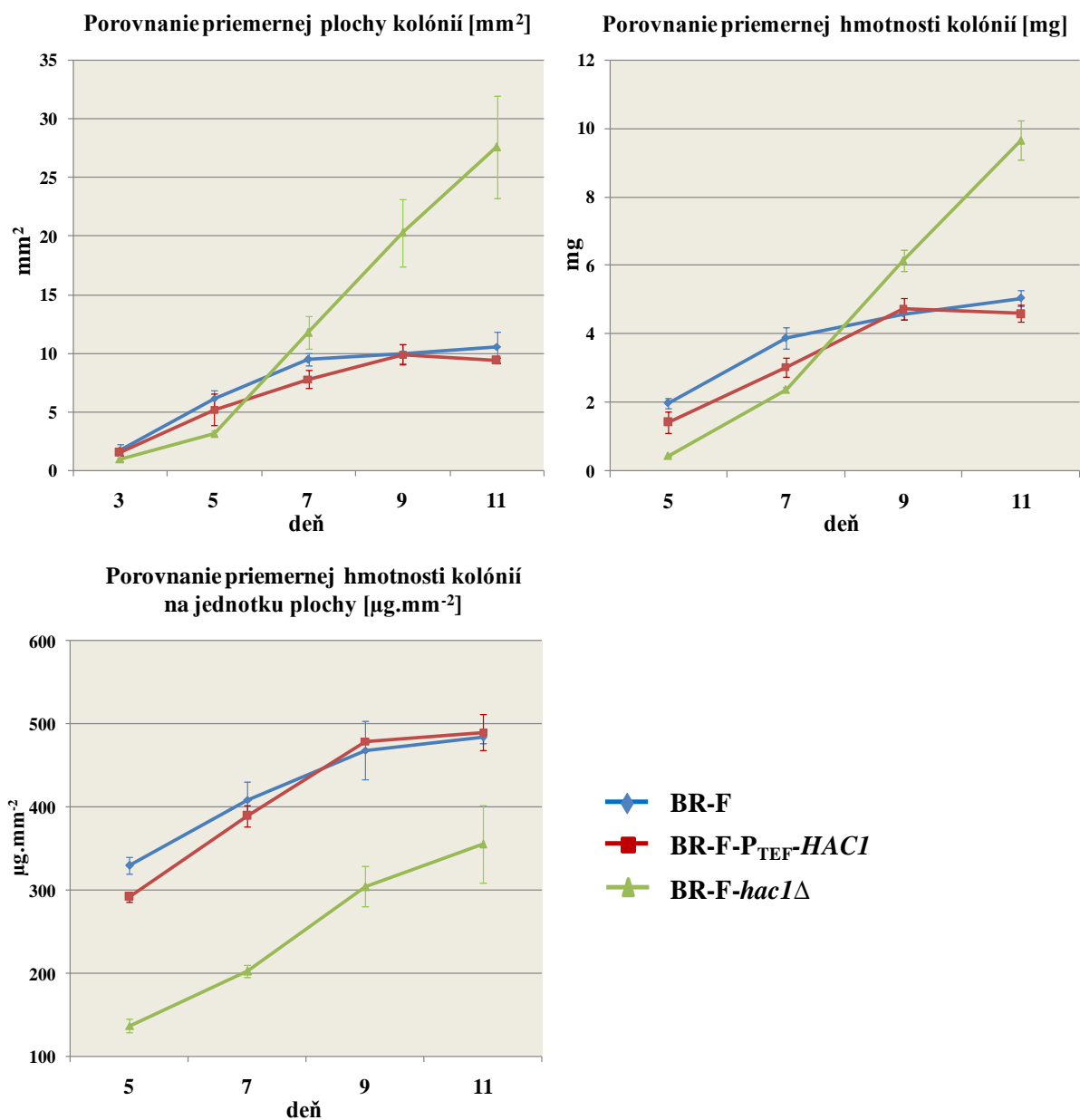
Túto rastovú analýzu som opakovala 2× s identickými problémami s hustotou výsevu a tak i s obdobnými výsledkami.

V tab. 25C je t-test poukazujúci na štatisticky významné rozdiely vyplývajúce z porovnávania priemernej plochy kolónií, hmotnosti kolónií a hmotnosti kolónií na jednotku plochy sledovaných kmeňov v 5., 7. a 9. deň vývoja. Vo všetkých troch sledovaných parametroch sa potvrdili štatisticky významné rozdiely medzi kmeňmi BR-F-Flo11p-GFP a *hac1Δ* (tab. 25C).

Štatisticky významné rozdiely sa prekvapivo ukázali aj medzi kmeňmi BR-F-Flo11p-GFP a P_{TEF} -*HAC1* v 5. a 7. deň vývoja. Sú pravdepodobne podmienené 1,3-1,5 - násobne vyšším priemerným počtom kolónií u kmeňa P_{TEF} -*HAC1* v 5., 7. a 9. deň vývoja, čo v dôsledku kontaktnej inhibície zníži priemernú plochu kolónií (Tab 25D – t-test rozdielov v počte kolónií). Od 9. dňa vývoja bol priemerný počet kolónií u oboch kmeňov porovnateľný a štatisticky významné rozdiely už pozorované neboli (tab. 25C, D).

Pri riedkych výsevoch kmeňov BR-F-Flo11p-GFP a P_{TEF} -*HAC1* nebol pozorovaný žiaden rozdiel v rýchlosti rastu ich kolónií a priemernej ploche kolónií.

GM



Obr. 33. Rastová analýza kmeňov *S. cerevisiae* s deléciou a zvýšenou expresiou génu *HAC1* odvodených od kmeňa BR-F-Flo11p-GFP na GM. Porovnanie rozdielov v priemernej ploche kolónií [mm²], hmotnosti kolónií [mg] a hmotnosti kolónií na jednotku plochy [µg.mm⁻²] v čase.

A

GM			
Počet zozbieraných kolónií / hmotnosť biomasy [g]			
	BR-F	BR-F-P _{TEF} -HAC1	BR-F-hac1Δ
5. deň	1254 / 2,501	1727 / 2,296	1194 / 0,508
7. deň	883 / 3,408	1236 / 3,701	731 / 1,731
9. deň	746 / 3,416	768 / 3,621	340 / 2,081
11. deň	708 / 3,559	835 / 3,825	284 / 2,729

B

Priemerný počet kolónií na platni, GM					
	3. deň	5. deň	7. deň	9. deň	11. deň
BR-F	171,6	125,4	110,4	124,3	118
BR-F-P _{TEF} -HAC1	227,3	191,9	154,5	128	139,2
BR-F-hac1Δ	56,5	66,3	60,9	56,7	47,3

C

t-test	Priemerná		Priemerná		Hmotnosť kolónií	
	plocha kolónií		hmotnosť kolónií		na jedn. plochy	
5. deň, GM						
BR-F vs. BR-F-P _{TEF} -HAC1	2,515E-02	*	5,592E-02		2,434E-02	*
BR-F vs. BR-F-hac1Δ	2,849E-07	**	1,840E-03	*	1,597E-04	**
7. deň, GM						
BR-F vs. BR-F-P _{TEF} -HAC1	1,333E-04	**	5,441E-03	*	9,546E-02	
BR-F vs. BR-F-hac1Δ	1,240E-03	*	7,468E-04	**	5,204E-04	**
9. deň, GM						
BR-F vs. BR-F-P _{TEF} -HAC1	4,713E-01		2,532E-01		3,482E-01	
BR-F vs. BR-F-hac1Δ	5,751E-04	**	2,467E-02	*	2,537E-02	*

D

Rozdiely v priemernom počte kolónií		
t-test		
3. deň, GM		
BR-F vs. BR-F-P _{TEF} -HAC1	3,808E-02	*
BR-F vs. BR-F-hac1Δ	3,804E-04	**
7. deň, GM		
BR-F vs. BR-F-P _{TEF} -HAC1	2,820E-04	**
BR-F vs. BR-F-hac1Δ	8,715E-06	**
9. deň, GM		
BR-F vs. BR-F-P _{TEF} -HAC1	3,224E-01	
BR-F vs. BR-F-hac1Δ	4,667E-04	**

Tab. 25. Detailné informácie o rastovej analýze kmeňov *S. cerevisiae* odvodených od kmeňa BR-F-Flo11p-GFP na GM a ich štatistická analýza. A - Počet zozbieraných kolónií a hmotnosť biomasy. B - Porovnanie priemerného počtu kolónií na miske v daný deň. C - Preukázanie štatistickej významnosti výsledkov pomocou t-testu. D – Overenie štatistickej významnosti v rozdieloch v počte kolónií pomocou t-testu.

5.5.3 Porovnanie morfológie buniek a intenzity signálu Flo11p-GFP pomocou mikroskopu

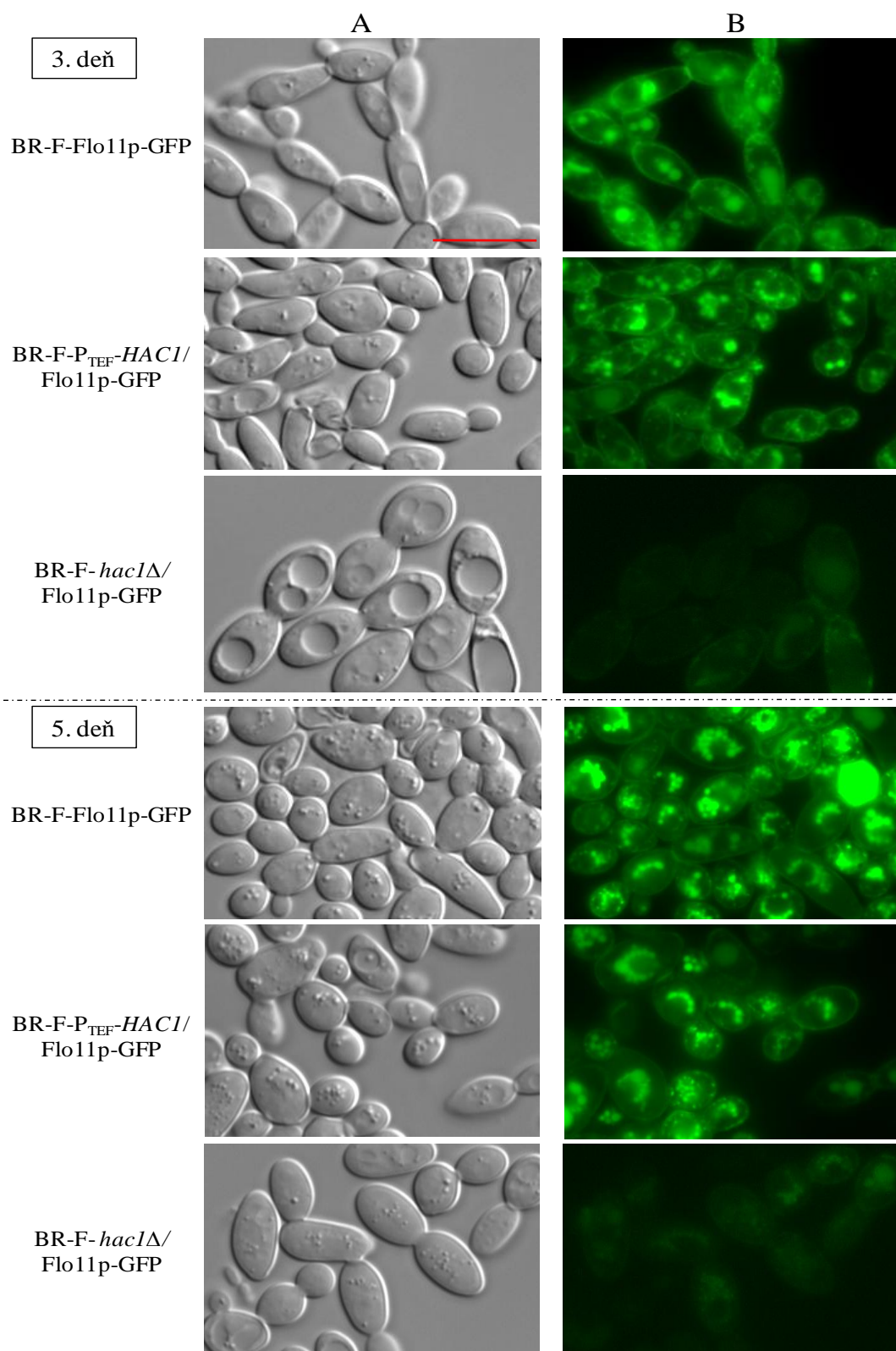
Cieľ: V čase porovnať morfológiu buniek a intenzitu fluorescenčného signálu Flo11p-GFP u kmeňov s deléciou a konštitutívnou expresiou génu *HAC1* s rodičovským kmeňom BR-F-Flo11p-GFP na GM.

Rodičovský kmeň BR-F-Flo11p-GFP tvorí na GM predĺžené bunky, ktoré vzájomne pevne adherujú a sú asociované v zhlukoch (Obr. 34A).

Kmeň s deléciou génu *HAC1* vytvára bunky predĺžené, značne zväčšené, vzájomne neadherujúce, čím sa líši od rodičovského kmeňa (Obr. 34A). Zväčšenie buniek kmeňa *hac1Δ* by bolo potrebné potvrdiť kvantitatívne meraním veľkosti väčšieho počtu buniek a následným t-testom, čomu som sa v rámci diplomovej práce nevenovala. Mikroskopicky pozorované zväčšené bunky kmeňa *hac1Δ* by mohli poukazovať na problémy s bunkovým delením alebo s reguláciou bunkového cyklu.

Kmeň so zvýšenou expresiou génu *HAC1* mal morfológiu buniek porovnateľnú s rodičovským kmeňom BR-F-Flo11p-GFP (Obr. 34A).

U kmeňov s deléciou a zvýšenou expresiou génu *HAC1* odvodených od kmeňa BR-F-Flo11p-GFP som porovnávala intenzitu fluorescenčného signálu Flo11p-GFP v čase. Medzi kmeňmi BR-F-Flo11p-GFP a P_{TEF} -*HAC1* bola intenzita fluorescenčného signálu Flo11p-GFP počas 3. a 5. dňa porovnateľná (Obr. 34B). Intenzívny fluorescenčný signál bol pozorovaný nielen z bunkovej steny, ale i z ER, kde dochádza ku syntéze tohto proteínu. U kmeňa s deléciou génu *HAC1* bol pozorovaný iba slabý fluorescenčný signál (Obr. 34B).

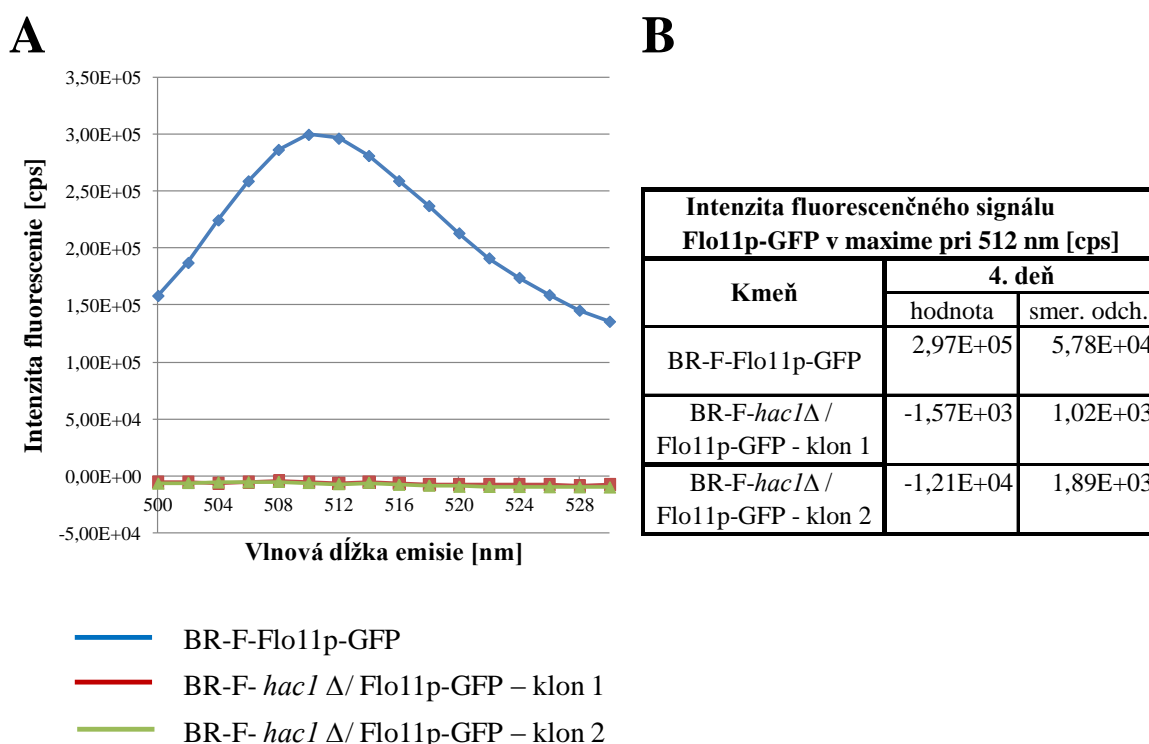


Obr. 34. Porovnanie morfológie buniek a intenzity fluorescenčného signálu Flo11p-GFP v čase u kmeňov *S. cerevisiae* odvodených od kmeňa BR-F-Flo11p-GFP na GM. Intenzita fluorescencie Flo11p-GFP bola snímaná pri 5 s. Červená mierka v pravom dolnom rohu prvého obrázka zodpovedá 10 μm; zväčšenie je u všetkých obrázkov rovnaké.

5.5.4 Porovnanie intenzity signálu Flo11p-GFP pomocou spektrofleurimetra

Cieľ: Overiť neprítomnosť fluorescenčného signálu Flo11p-GFP u dvoch klonov s deléciou génu *HAC1* v porovnaní s kmeňom BR-F-Flo11p-GFP meraním na monokolóniách *in situ* pomocou spektrofleurimetra externou sondou na GM (Metóda 4.2.4.8).

Neprítomnosť fluorescenčného signálu Flo11p-GFP bola preukázaná u 4 dni starých kolónií kmeňov s deléciou génu *HAC1* i pomocou spektrofleurimetra (Obr. 35). Každá hodnota v obr. 35A, B je priemerom z meraní 3 monokolónií. Pri vyhodnocovaní meraní bola od intenzity fluorescence každého značeného kmeňa odpočítaná hodnota intenzity autofluorescence neznačeného kmeňa toho istého genotypu. Kmeň s deléciou génu *HAC1* odvodený od neznačeného rodičovského kmeňa BR-F (v našom prípade negatívna kontrola pre kmene BR-F- *hac1Δ*/ Flo11p-GFP) nemal v porovnaní s rodičovským kmeňom zmenený morfolotyp. Predpokladáme, že proteín Hac1p priamo alebo nepriamo ovplyvňuje expresiu génu *FLO11* alebo hladinu jeho proteínu. Meranie uvedené na obr. 35 bolo prevedené RNDr. Schierovou, PhD., ktorej ďakujem za láskavé poskytnutie výsledkov.



Obr. 35. Porovnanie intenzity fluorescenčného signálu Flo11p-GFP u dvoch kmeňov *S. cerevisiae* s deléciou génu *HAC1* (klon 1 a 2) v porovnaní s rodičovským kmeňom BR-F-Flo11p-GFP na GM počas 4. dňa vývoja monokolónií. A – grafické znázornenie, B - Maximálne hodnoty fluorescenčného signálu Flo11p-GFP namerané pri 512 nm. Intenzita signálu bola snímaná *in situ* pomocou externej sondy spektrofleurimetra. Každá krivka je priemerom z meraní 3 monokolónií. Meranie bolo prevedené RNDr. Schierovou, PhD.

5.6 Porovnanie citlivosti kmeňov voči rôznym typom inhibítorov

Cieľ: Porovnať citlivosť kmeňov s deléciou a konštitutívnou expresiou génu *HAC1* odvodených od kmeňov *PORT* a *BR-F-Flo11p-GFP* navzájom a s príslušným rodičovským kmeňom v prítomnosti rôznych typov inhibítorov.

Citlivosť kmeňov s deléciou a konštitutívnou expresiou génu *HAC1* v porovnaní s rodičovským kmeňom *PORT* alebo *BR-F-Flo11p-GFP* som testovala tzv. DTT testom (Metóda 4.2.4.7) a pomocou kvapkových testov pri rôznych teplotách a v prítomnosti rôznych typov inhibítorov (Metóda 4.2.4.6).

Pri DTT teste som vedľa seba nakvapkala päť 10 µl kvapiek s hustotou bunkovej suspenzie cca 10-20 b./kvapka. 150 µl 0,4 M DTT som pridávala ihneď po nakvapkaní bunkových suspenzií do vopred vyhlúbenej jamky (Petriho miska ø 90 mm, 20-25 ml GM v miske). Vplyv koncentračného gradientu DTT na rast som sledovala v čase. Ako som už spomínala, DTT je induktorom UPR v ER brániaci tvorbe disulfidických mostíkov, čo vedie k hromadeniu nesprávne zbalených proteínov.

Pri kvapkovom teste som nanášala 6 kvapiek o objeme 5 µl, kde počet buniek v kvapke klesal od $10^6 \rightarrow 10^1$ buniek v poslednej kvapke. Mechanizmus pôsobenia inhibítorov použitých v kvapkových testoch je v tab. 26.

Inhibítor (skratka)	Mechanizmus pôsobenia
Kadmium (Cd)	vyvoláva oxidatívny stres, peroxidáciu lipidov, denaturáciu proteínov, poškodenie DNA, apoptózu; hlavným cieľom jeho toxicity je ER (BAUDOUIN-CORNU a LABARRE 2006, VALKO a kol. 2006)
Meď (Cu)	vyvoláva oxidatívny stres, peroxidáciu membránových lipidov, oxidáciu proteínov, poškodenie RNA a DNA (HALLIWELL a GUTTERIDGE 1984, PENA a kol. 1998)
2-deoxy-D-glukóza (2-DG)	analóg D-glukózy, naruša metabolické procesy zahrnuté v biosyntéze bunkovej steny, napr. syntézu β -1,3-glukánu; pri absencii metabolizovateľných zdrojov cukru inhibuje rast (BIELY a kol. 1971, KRÁTKY a kol. 1975, MOORE 1981)
Calcofluor White (CFW)	agens rozrušujúci bunkovú stenu - inhibuje syntézu chitínu a glukánu (RAM a KLIS 2006)
Congo Red (CR)	rovnaká funkcia ako CFW (RAM a KLIS 2006)

Tab. 26. Inhibítory použité v kvapkových testoch a mechanizmus ich pôsobenia.

Pri DTT teste sa prejavila vysoká citlivosť kmeňov s deléciou génu *HAC1* k najvyššej koncentrácii DTT. Kmene so zvýšenou expresiou génu *HAC1* sú voči DTT rezistentné (Obr. 36). Pri riedkom výseve kmeňov *PORT* a *PORT-P_{TEF}-HAC1* indukuje DTT tvorbu vrásčitých kolónií (vid' Obr. 36A, naznačené červenými šípkami). U kmeňa *PORT-hac1Δ*

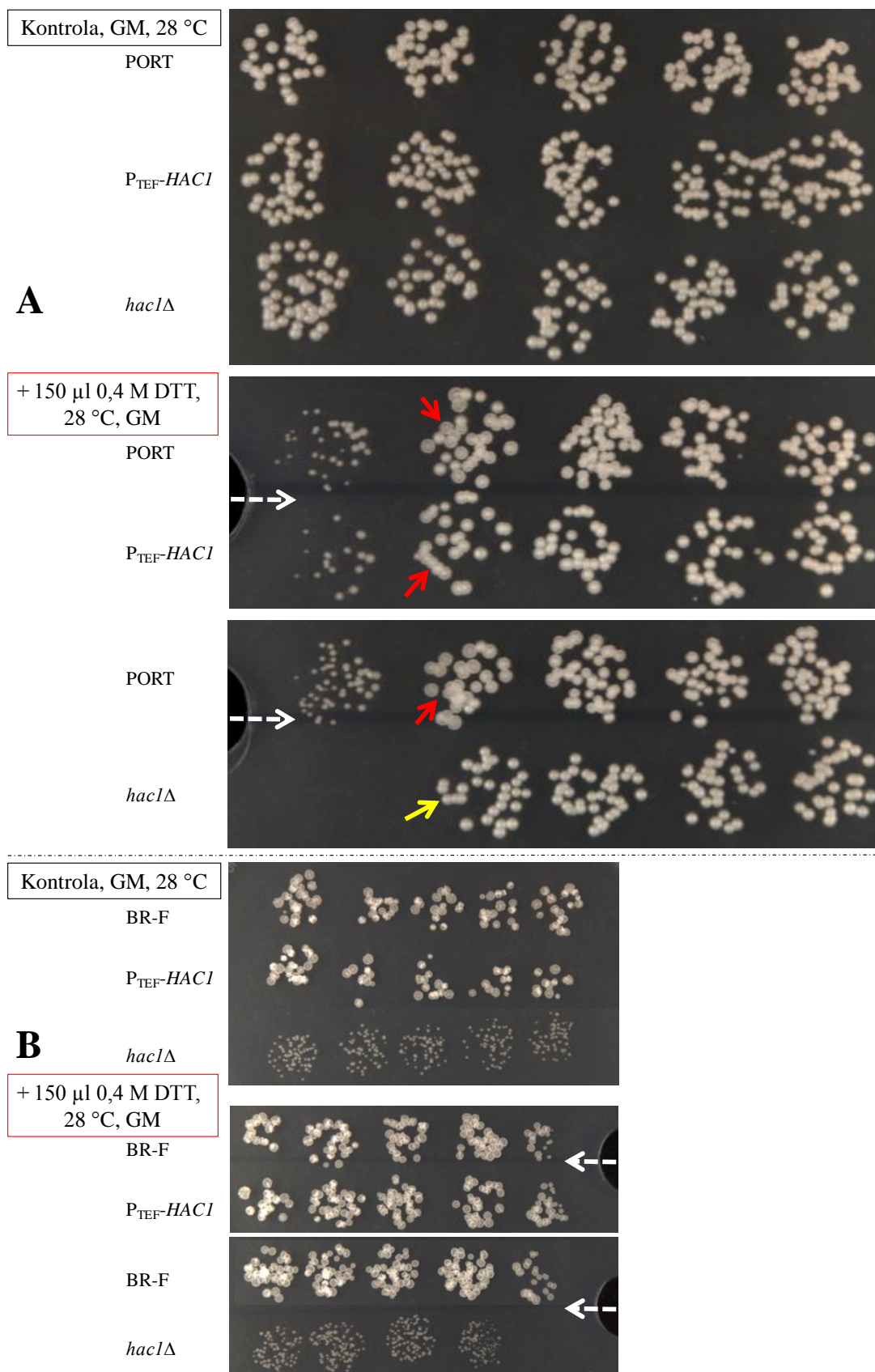
k indukcii vrásčitosti nedochádza, kolónie ostávajú hladké (vid' Obr. 36A, naznačené žltou šípkou).

Pri kvapkových testoch sa preukázala rôzna úroveň citlivosti rodičovských kmeňov PORT a BR-F-Flo11p-GFP na použité inhibítory. Kmeň BR-F-Flo11p-GFP, v porovnaní s kmeňom PORT, má zníženú rezistenciu voči teplotnému šoku (1 h, 50 °C), nerastie v prítomnosti 0,3 mM Cd a 1 mM Cu. U kmeňov odvodených od PORT sme používali 3× vyššiu koncentráciu Cu a nárast rodičovského kmeňa bol pozorovaný do úrovne 3. kvapky s hustotou 10^4 buniek (3. deň). Kmeň BR-F-Flo11p-GFP nie je citlivý voči 0,003% CFW, kmeň PORT rástol v tejto koncentrácii CFW do úrovne 3. kvapky. Treba pripomenúť, že oba tieto kmene sa líšia svojím pôvodom a odlišným genetickým pozadím (Obr. 37, Obr. 38 - 1. a 2. časť).

Kmene s deléciou a zvýšenou expresiou génu *HAC1* odvodené od oboch rodičovských kmeňov odpovedali na prítomnosť inhibítorov rovnako. Kvapkové testy preukázali zníženú rezistenciu delečných kmeňov *hac1Δ* voči 2-DG (0,3 mM, 28 °C), CFW (0,003%, 37 °C), 0,02% CR (testované iba u kmeňov odvodených od BR-F-Flo11p-GFP) a mierne taktiež voči teplote 37 °C pri kultivácii na GM v porovnaní s rodičovskými kmeňmi (Obr. 37, Obr. 38 - 1. a 2. časť). Kmeň PORT- *hac1Δ* mal zníženú rezistenciu voči Cd (0,3 mM, 28 °C). Rezistencia kmeňov so zvýšenou expresiou génu *HAC1* bola porovnateľná s príslušným rodičovským kmeňom, s výnimkou kmeňa PORT-*P_{TEF}-HAC1* s mierne zníženú rezistenciu voči 2-DG (0,3 mM, 28 °C) (Obr. 37, Obr. 38 - 1. a 2. časť).

Pri kvapkových testoch kmeňov odvodených od BR-F-Flo11p-GFP som použila dva nezávislé klony s deléciou a zvýšenou expresiou génu *HAC1* (*hac1Δ*/ a, b; *P_{TEF}-HAC1*/ a, b). Morfológia ich 5 dní starých kolónií je uvedená na obr. 39.

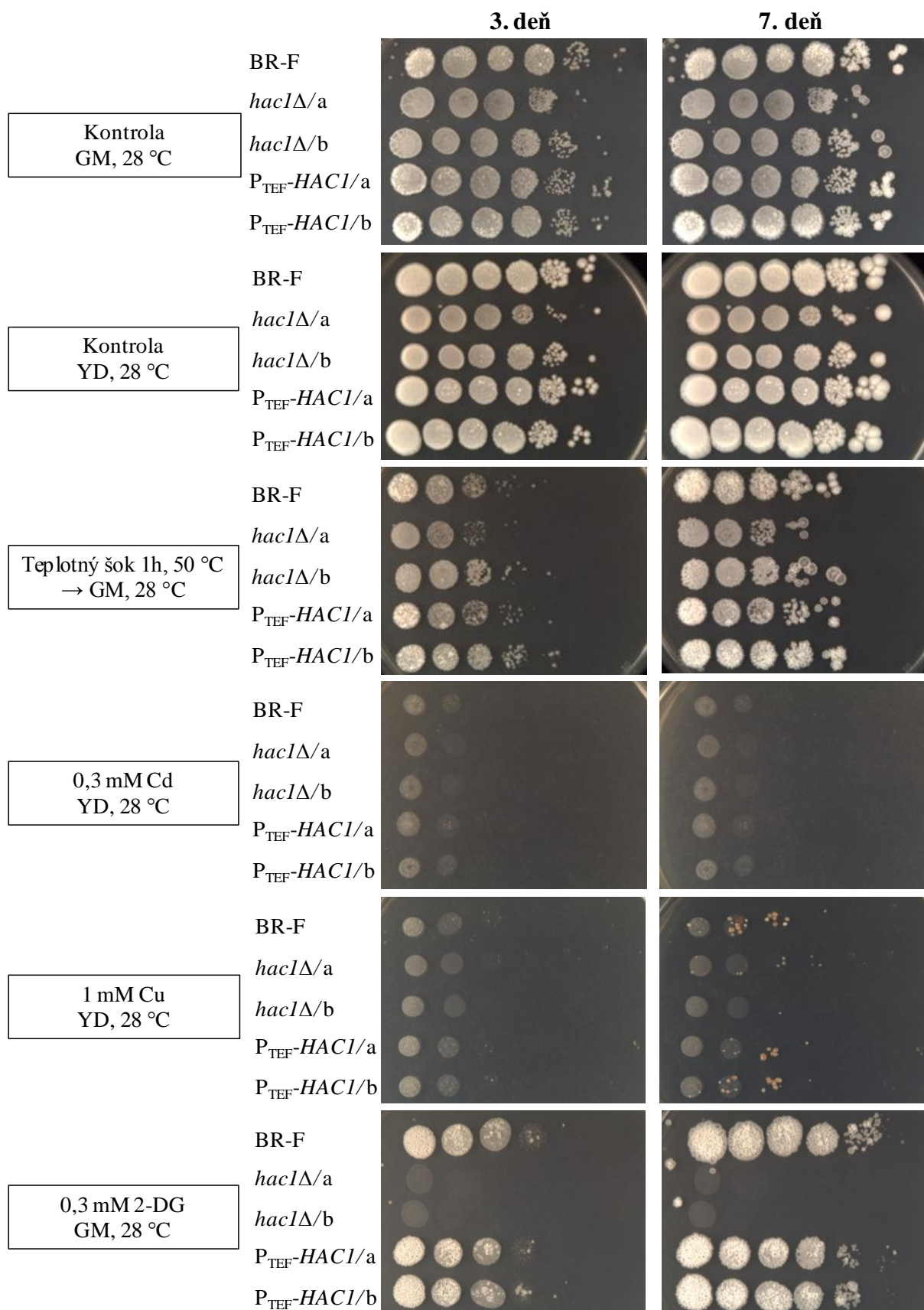
DTT testy a kvapkové testy som zopakovala 3× s obdobnými výsledkami.



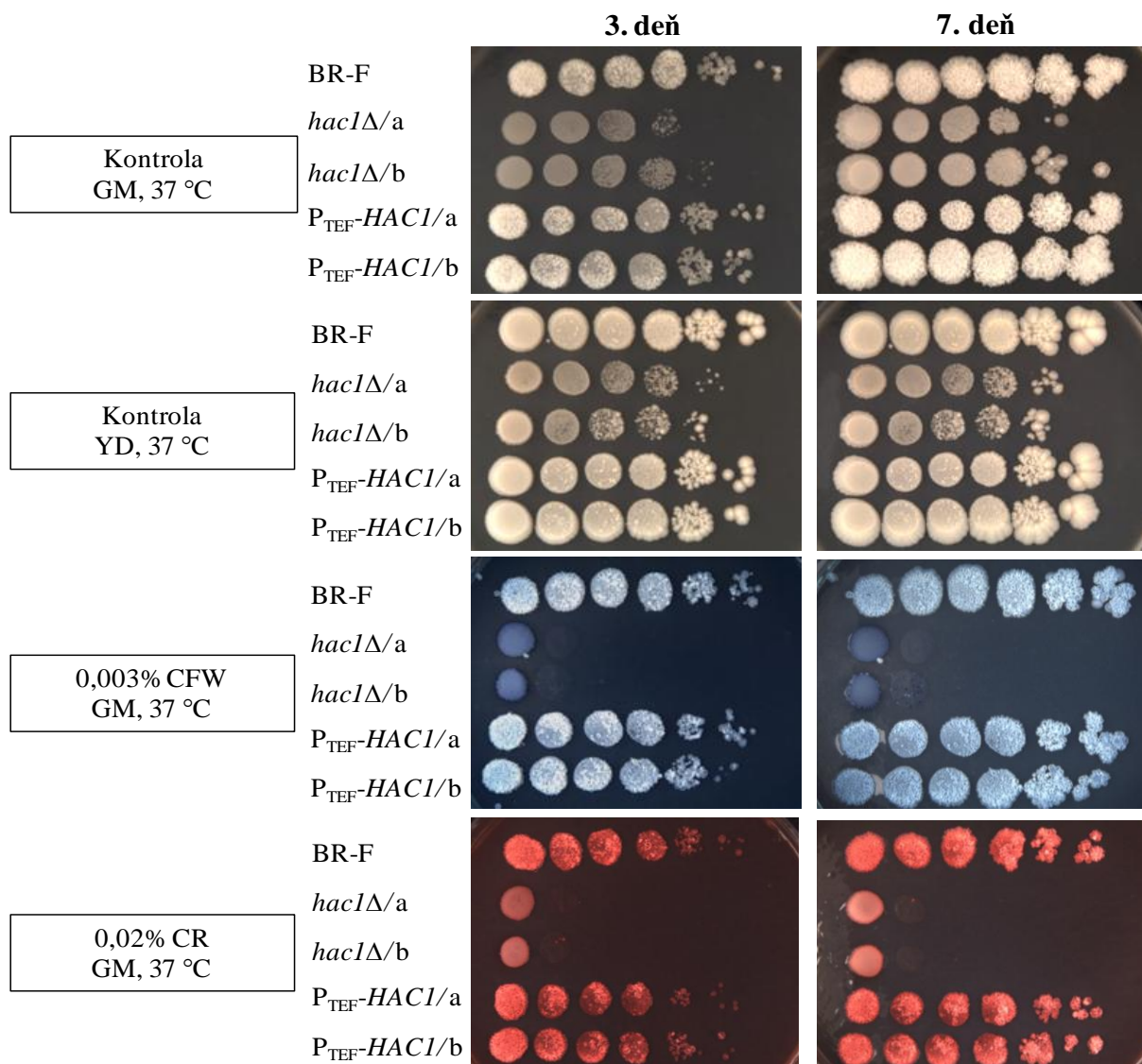
Obr. 36. DTT testy porovnávajúce odolnosť kmeňov *S. cerevisiae* odvodených od kmeňov PORT (A) a BR-F-Flo11p-GFP (B) voči koncentračnému gradientu 150 μ l 0,4 M DTT po 3 dňoch inkubácie v 28 °C. DTT indukuje vrásčitosť kolónií kmeňov PORT a $P_{TEF}-HAC1$ (označené červenými šípkami), kolónie kmeňa $PORT-hac1\Delta$ ostávajú hladké (označené žltou šípkou). Bielou prerušovanou šípkou je naznačený smer gradientu DTT.



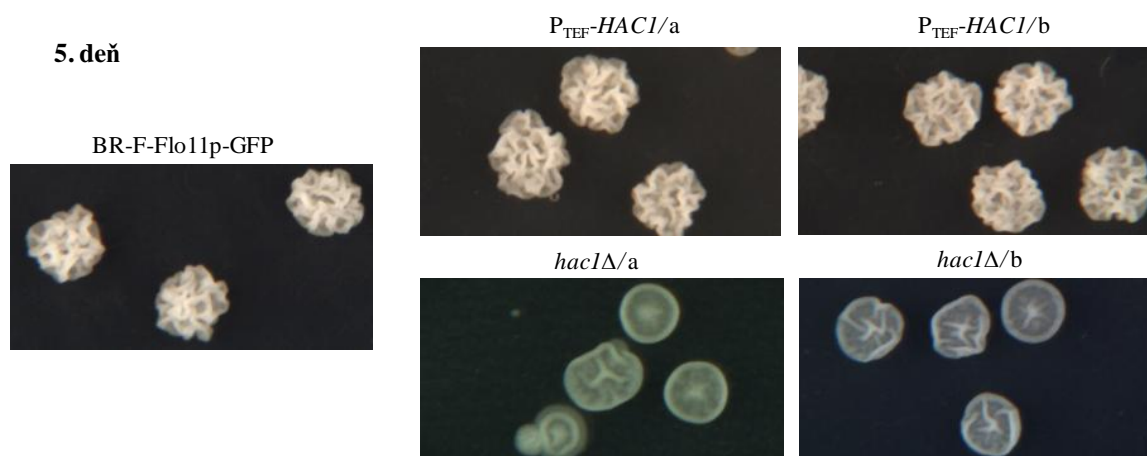
Obr. 37. Kvapkové testy porovnávajúce odolnosť kmeňov *S. cerevisiae* s deléciou a zvýšenou expresiou génu *HAC1* odvodené od kmeňa PORT pri kultivácii v prítomnosti rôznych typov inhibítorov a pri rôznych teplotách.



Obr. 38. – 1. časť. Kvapkové testy porovnávajúce odolnosť kmeňov *S. cerevisiae* s deléciou a zvýšenou expresiou génu *HAC1* odvodené od kmeňa BR-F-Flo11p-GFP pri kultivácii v prítomnosti rôznych typov inhibítorov pri teplote 28 °C.



Obr. 38. – 2. časť. Kvapkové testy porovnávajúce odolnosť kmeňov *S. cerevisiae* s deléciou a zvýšenou expresiou génu *HAC1* odvodené od kmeňa BR-F-Flo11p-GFP pri kultivácii v prítomnosti agens rozrušujúceho bunkovú stenu pri teplote 37 °C.



Obr. 39. Morfológia 5 dní starých monokolónií kmeňov *S. cerevisiae* s deléciou a zvýšenou expresiou génu *HAC1* odvodených od kmeňa BR-F-Flo11p-GFP využitých pri kvapkových testoch.

5.7 Morfologické charakteristiky kolónií kmeňov s deléciou *HAC1* odvodených od kmeňov BY4742 a ΣS^h

Cieľ: Morfologicky charakterizovať kmene s deléciou génu *HAC1* odvodené od haploidných laboratórnych kmeňov BY4742 a ΣS^h na GM.

Delécia génu *HAC1* znížila vrásčitosť štruktúrovaných kolónií diploidných, „divokých“ kmeňov *Saccharomyces cerevisiae* PORT a BR-F-Flo11p-GFP a spomalila ich vegetatívny rast. Rozhodli sme sa, že efekt delécie génu *HAC1* otestujeme aj u dvoch haploidných laboratórnych kmeňov BY4742 a ΣS^h . Kmeň BY4742 tvorí na GM hladké kolónie (Obr. 40A), kmeň ΣS^h tvorí na GM kolónie vrásčité podobné kolóniám kmeňa BR-F (Obr. 41A).

Deléciou génu *HAC1* u kmeňa BY4742 boli získané klony, ktoré sa nelíšili od rodičovského kmeňa morfológiou, veľkosťou kolónií ani rýchlosťou vegetatívneho rastu (Obr. 40A). Kolónie kmeňa BY4742-*hac1Δ*, podobne ako kolónie kmeňa BY4742, do GM nezarastali (Obr. 40B). V prítomnosti koncentračného gradientu 150 μ l 0,4 M DTT (Metóda 4.2.4.7) sa prejavila vysoká citlivosť kmeňov s deléciou génu *HAC1* k najvyššej koncentrácii DTT (Obr. 40C). Inhibičný vplyv DTT na rast kolónií kmeňa BY4742-*hac1Δ* je zrejmý aj v 2. kvapke (v smere koncentračného gradientu DTT), kde je priemerná veľkosť kolónií menšia než u ostatných kvapiek (Obr. 40C).

Vplyv delécie génu *HAC1* na morfogénzu kvasinkových kolónií sa potvrdil u laboratórneho kmeňa ΣS^h . Po transformácii buniek *S. cerevisiae* ΣS^h , s využitím delečnej kazety pripravenej z plazmidu pAG25, som získala niekoľko klonov ΣS^h -*hac1Δ*. Tri z nich (klony 1, 2, 3) som vysiala na GM a každý z nich vytváral zmes dvoch morfológií – kolónie hladké (resp. s jemnou centrálnou vrásčitou kresbou) a kolónie „ostružinovité“ (Obr. 41B). Percentuálne zastúpenie jednotlivých morfológií u každého kmeňa je uvedené na Obr. 41B napravo. Pomocou reakcie PCR bola delécia génu *HAC1* potvrdená u všetkých izolovaných individuálnych kolónií (overené 2 hladké kolónie, resp. kolónie s jemnou centrálnou vrásčitou kresbou a 2 „ostružinovité“ kolónie) z výsevu každého klonu.

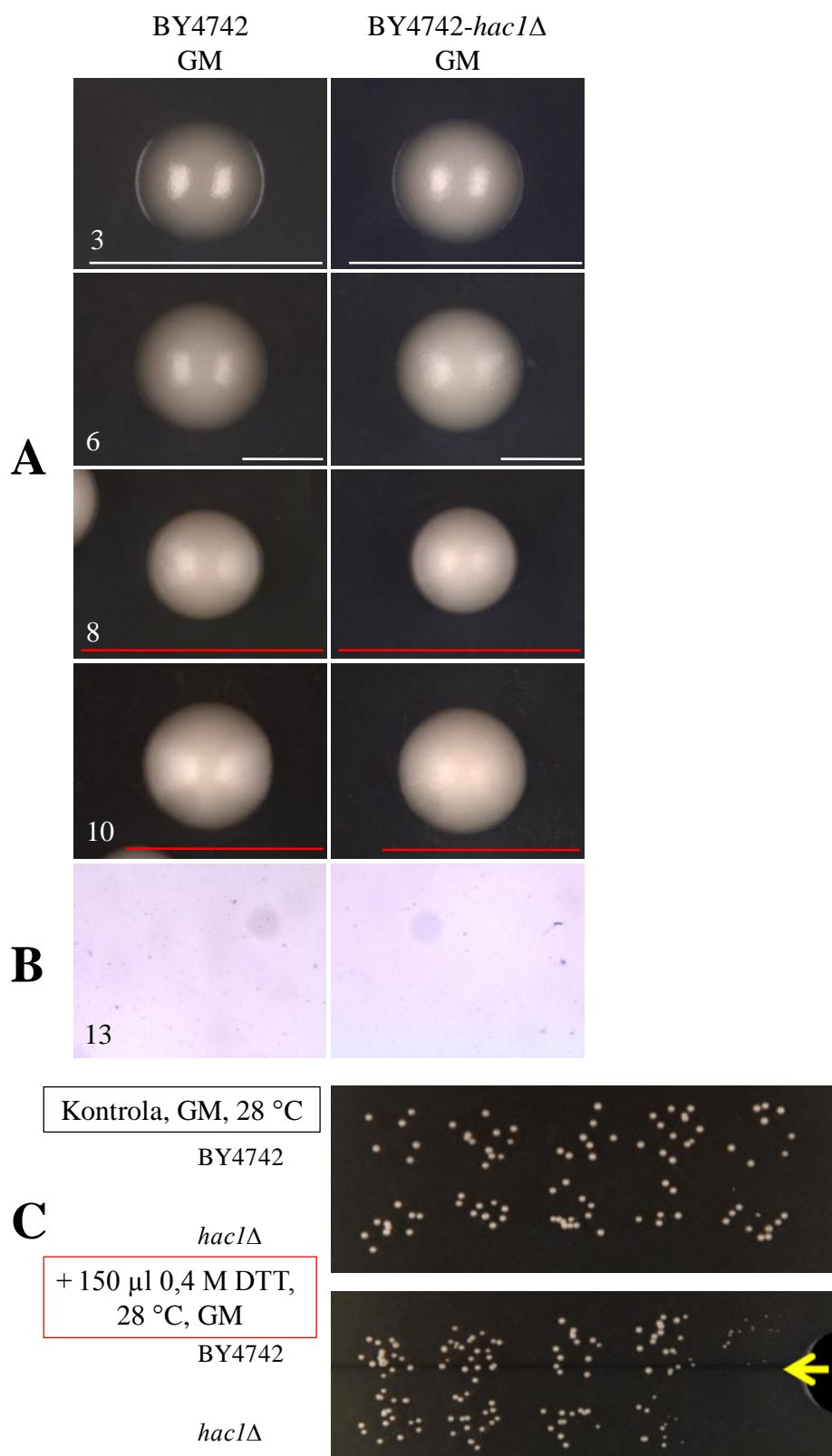
V ďalšom kroku som sa rozhodla overiť stabilitu príslušného morfológu tzv. purifikačným výsevom. Z každého klonu som na výsev použila 1-2 individuálne monokolónie daného morfológu staré 6 dní – izoláty 1-A, 1-B, 2-A, 3-A, 3-B (Obr. 42). Morfogénzu som sledovala v čase. Na obr. 42 sú výseky z platní so 6 dní starými kolóniami, aby sme ich morfológiu mohli porovnať s morfológiou pôvodného izolátu.

Kolónie pôvodne polovrásčitého izolátu s hladkým okrajom 1-A ostali polovrásčité. Kolónie pôvodne hladkých izolátov 2-A a 3-A tvorili stabilné hladké-mierne polovrásčité kolónie s hladkým okrajom. Prekvapivo dopadli výsevy izolátov s pôvodne „ostružinovým“ morfortypom (izoláty 1-B a 3-B), u ktorých sa pôvodne popísaný morfortyp „ostružiny“ vôbec neobjavil. Klon 1-B vytvoril po výseve zmes morfortypov – menšie i väčšie heterogénne polovrásčité kolónie s nepravidelným okrajom neschopné vertikálneho rastu, podobné kolóniám kmeňa BR-F- *hac1Δ*/ Flo11p-GFP. Heterogénnosť sa potvrdila i „modrou stopou“ (Obr. 42, klon 1-B). Klon 3-B vytváral na GM kolónie so stabilným polovrásčitým morfortypom neschopné vertikálneho rastu.

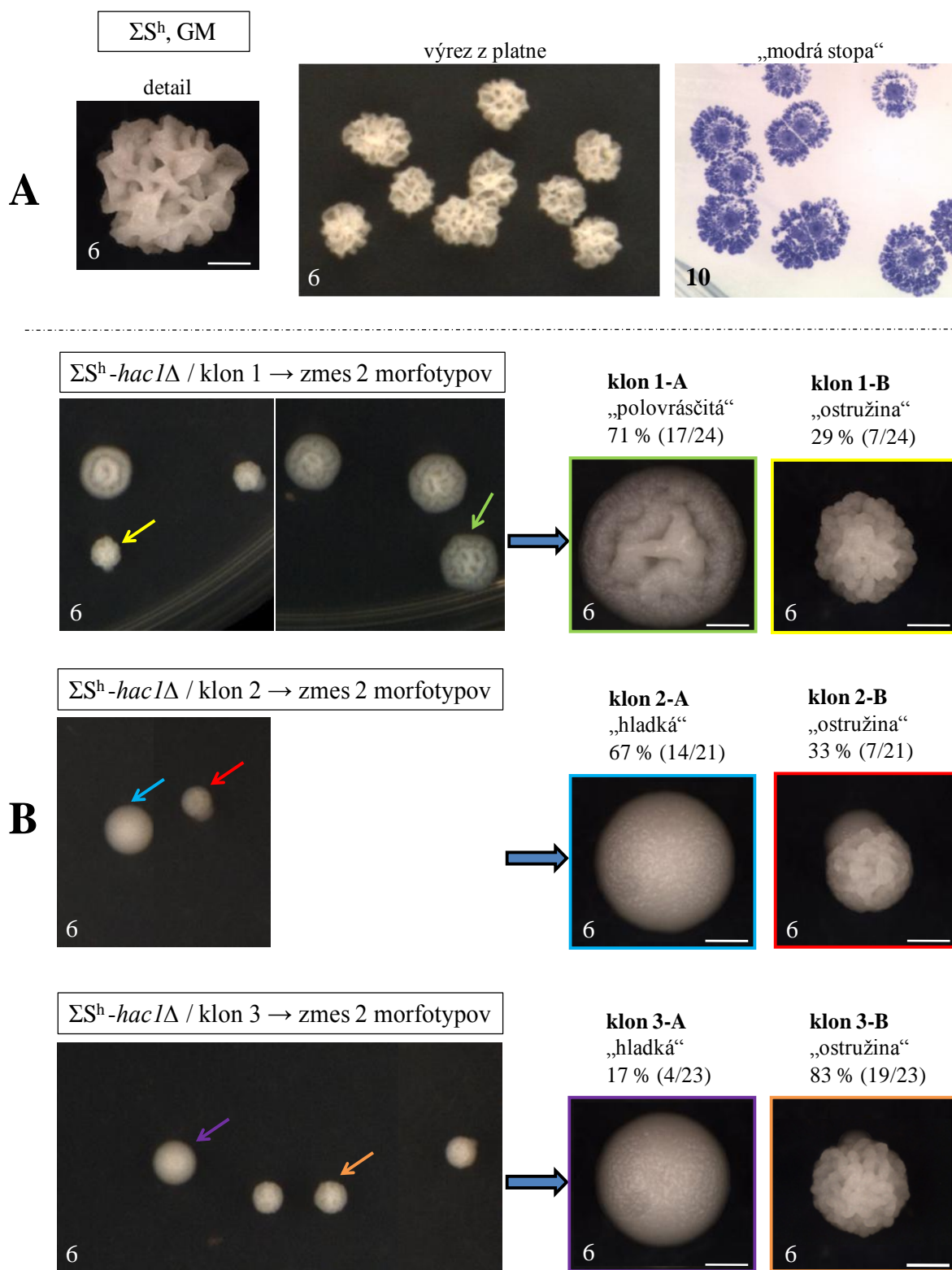
Charakter vrastania do média som u jednotlivých morfortypov porovnávala „modrou stopou“ v 10. deň vývoja kolónií (Metóda 4.2.4.2). Rodičovský kmeň ΣS^h má kyticovitý charakter zarastania do GM, podobný kmeňu BR-F-Flo11p-GFP na GM a kmeňu PORT na GM+0,05 mM Se (Obr. 41A napravo). Stopy kolónií s hladkým morfortypom (resp. s jemnou centrálnou vrásčitou kresbou) izolátov 1-A, 2-A a 3-A mali v agare pravidelný a celistvý tvar (Obr. 42). Ako som už spomínala klon 1-B vytváral heterogénnu „modrú stopu“ – niektoré stopy sú totožné so stopu kolónií rodičovského kmeňa, čo by mohlo naznačovať zmes transformovaných a netransformovaných buniek. Ďalším purifikačným výsevom kmeňa 1-B som sa nevenovala. Klon 3-B s polovrásčitým morfortypom vytvára v agare stopu podobnú kmeňu ΣS^h (Obr. 42).

U kmeňov ΣS^h -*hac1Δ* som sa taktiež pokúšala o overenie ich citlivosti voči koncentračnému gradientu 150 μ l 0,4 M DTT (Metóda 4.2.4.7). Napriek snahe a 4× opakovaniu testu sa mi nepodarilo pripraviť správnu hustotu bunkovej suspenzie (cca 10-20b. v 10 μ l kvapke) u kmeňa ΣS^h a delečných kmeňov s polovrásčitým morfortypom *hac1Δ*/ 1-B a 3-B. Hustotu bunkovej suspenzie som stanovovala pomocou spektrofotometra i mikroskopicky. Možnou príčinou je tvorba zhlukov v bunkovej suspenzii.

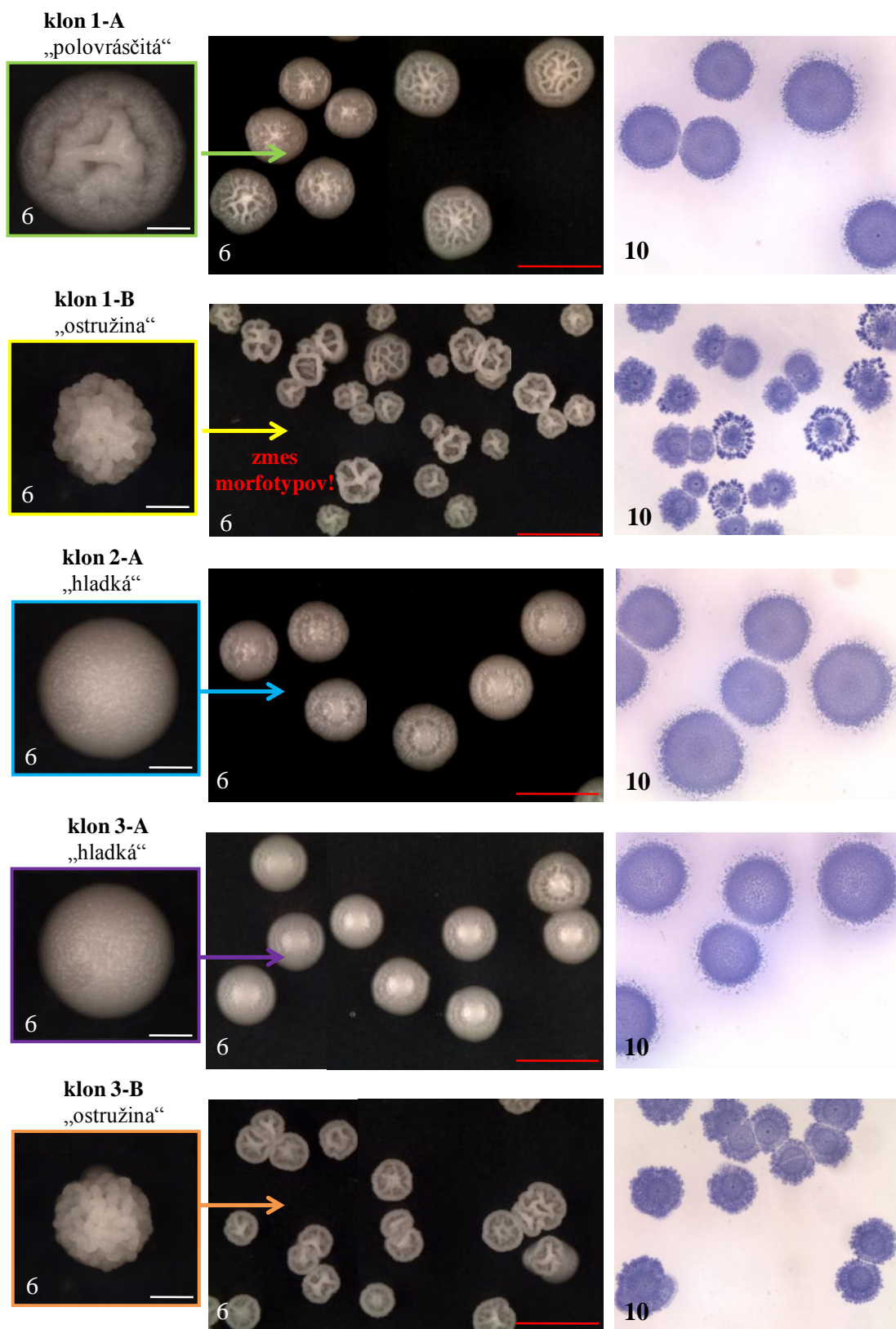
Deléciou génu *HAC1* u kmeňa ΣS^h sa potvrdil vplyv *HAC1* na morfogénu štruktúrovaných kvasinkových kolónií za nestresových podmienok.



Obr. 40. Morfologické charakteristiky kolónií kmeňa *S. cerevisiae* BY4742-*hac1*Δ v porovnaní s rodičovským kmeňom BY4742 na GM. Porovnanie ich odolnosti voči koncentračnému gradientu DTT (150 μl 0,4 M DTT). **A – morfogenéza kolónií (biela mierka 1 mm, červená mierka 5 mm), **B** – určenie charakteru vrastania kolónií do média pomocou „modrej stopy“. V ľavom dolnom rohu snímky je uvedený vek kolónie v dňoch. **C** – DTT test - po 5 dňoch inkubácie v 28 °C. Žltou šípkou je naznačený smer gradientu DTT.**



Obr. 41. Morfológické charakteristiky kolónií kmeňov *S. cerevisiae* ΣS^h -*hac1Δ* v porovnaní s rodičovským kmeňom ΣS^h na GM. A – vľavo detail 6 dní starej kolónie kmeňa ΣS^h , v strede pohľad na výrez misky, napravo určenie charakteru vrastania kolónií do média pomocou „modrej stopy“. B – Výsev troch nezávislých klonov ΣS^h -*hac1Δ*. Naľavo zmes ich morfológicky odlišných typov kolónií, vpravo jednotlivé izolované morfortypy a ich percentuálne zastúpenie vo výseve. Farba šípky ukazujúca na určitý morfortyp na obrázku naľavo súhlasí s orámovaním obrázku danej kolónie napravo. Biela mierka zodpovedá 1 mm, v ľavom dolnom rohu snímky je uvedený vek kolónií v dňoch.



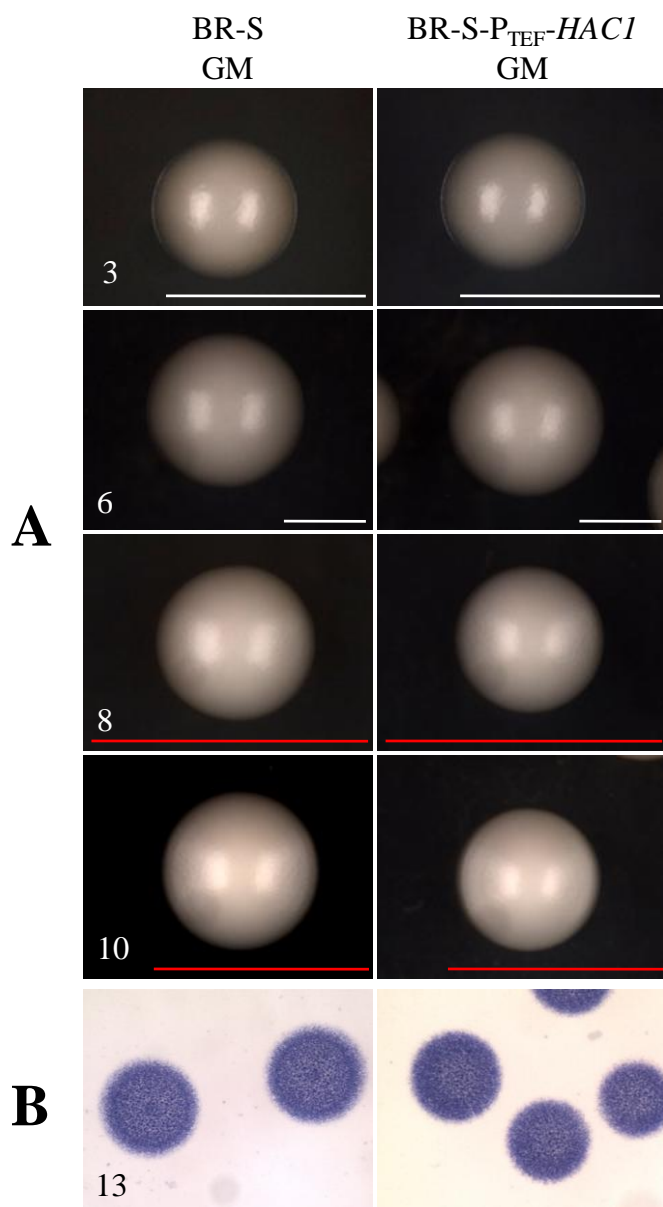
Obr. 42. Morfologické charakteristiky kolónií kmeňov *S. cerevisiae* ΣS^h -*hac1* Δ po výseve jednotlivých izolovaných morfolotypov (vid' Obr. 41B) a určenie charakteru vrastania kolónií do média pomocou „modrej stopy“. Purifikačný výsev bol prevedený na GM priamo zo 6 dní starej monokolónie príslušného morfolotypu (kolónia naľavo v rámečku). Biela mierka zodpovedá 1 mm, červená mierka 5 mm, v ľavom dolnom rohu snímky je uvedený vek kolónií v dňoch.

5.8 Morfologické charakteristiky kolónií kmeňov so zvýšenou expresiou *HAC1* odvodených od kmeňa BR-S

Cieľ: Morfologicky charakterizovať kmene so zvýšenou expresiou *HAC1* odvodené od kmeňa BR-S na GM.

Delécia génu *HAC1* znížila vrásčitosť štruktúrovaných kolónií „divokých“ kmeňov *Saccharomyces cerevisiae* PORT a BR-F-Flo11p-GFP a prírodného kmeňa Σ^h . Zaujímalo nás, či konštitutívna expresia génu *HAC1* pod kontrolou promótoru TEF nebude viesť ku indukcii vrásčitého fenotypu u kmeňa BR-S. Kmeň BR-S je odvodený od kmeňa BR-F jeho domestikáciou za laboratórnych podmienok a kultiváciou na bohatom agarovom médiu. Na GM vytvára hladké kolónie podobné kolóniám laboratórnych kmeňov (KUTHAN a kol. 2003).

Klony s konštitutívnou expresiou génu *HAC1* odvodené od kmeňa BR-S svoju morfológiu, veľkosť kolónií a rýchlosť vegetatívneho rastu na GM v porovnaní s rodičovským kmeňom nezmenili (Obr. 43A). Stopa v agare kmeňov BR-S a BR-S-P_{TEF}-*HAC1* je rovnaká – má pravidelný a celistvý tvar (Obr. 43B).



Obr. 43. Morfologické charakteristiky kolónií kmeňa *S. cerevisiae* BR-S-P_{TEF}-*HAC1* v porovnaní s rodičovským kmeňom BR-S na GM. A – morfogenéza kolónií (biela mierka 1 mm, červená mierka 5 mm), B – určenie charakteru vrastania kolónií do média pomocou „modrej stopy“. V ľavom dolnom rohu snímky je uvedený vek kolónií v dňoch.

6 Diskusia

Prírodné, „divoké“ kmene *Saccharomyces cerevisiae* vytvárajú, na rozdiel od hladkých kolónií väčšiny laboratórných kmeňov, štruktúrované kolónie podobné biofilmom, ktoré im umožňujú dlhodobo prežívať v nepriaznivých podmienkach vonkajšieho prostredia (DONLAN a COSTERTON 2002, PALKOVÁ 2004). Pre biofilm kolónie kvasiniek je charakteristická produkcia ECM bohatej na polysacharidy, schopnosť udržiavať vysoký podiel vody a produkcia adhézneho proteínu Flo11p, ktorý je nevyhnutný pre adhéziu buniek navzájom, pre adhéziu buniek k substrátu a vytvorenie štruktúrovanej kvasinkovej kolónie (ŠŤOVÍČEK a kol. 2010, VOPÁLENSKÁ a kol. 2010).

V rámci tejto diplomovej práce som sa snažila objasniť vplyv vytipovaného proteínu Hac1p na morfogénzu dvoch štruktúrovaných prírodných kmeňov *S. cerevisiae* BR-F-Flo11p-GFP a PORT s odlišným genetickým pozadím. Kmeň BR-F, izolovaný z vôd rybníka, vytvára štruktúrované, vrásčité kolónie na pevnom komplexnom médiu s 3% glycerolom. Vinársky kmeň PORT tvorí na pevnom komplexnom médiu s 3% glycerolom hladké až polovrásčité kolónie. V prítomnosti nízkej koncentrácie selénanu sodného (0,05 mmol Na₂SeO₄) vytvára kmeň PORT štruktúrované kolónie s prírastkom biomasy vyšším než u kultúry rastúcej na GM. Mechanizmus indukcie vrásčitého fenotypu u kmeňa PORT po pridaní Na₂SeO₄ do média nie je známy a naďalej sa v našom laboratóriu pod vedením RNDr. Schierovej, PhD. skúma.

6.1 Vplyv selénu

V štúdiách sa prevažne popisuje vplyv selenidu (H₂Se) a seleničitanu (SeO₃⁻²) na metabolizmus kvasinky *S. cerevisiae*, pričom ich efekt je sledovaný pri podstatne vyšších koncentráciách a pri krátkodobom pôsobení. Na základe toho nie je možné porovnať naše výsledky so štúdiami ďalších autorov.

Vysoké koncentrácie zlúčenín selénu (1 mmol – 5 mmol) sú pre kvasinky toxické - spomalí sa exponenciálny rast, zníži sa počet buniek vstupujúcich do stacionárnej fázy bunkového cyklu, indukuje sa oxidatívny stres, zvyšuje sa frekvencia mutácií a vznik dvojreťazcových zlomov DNA, bunka vstupuje do apoptózy (PINSON a kol. 2000, LETAVAYOVÁ a kol. 2008, IZQUIERDO a kol. 2010). V ľudskom organizme je selén hlavnou štruktúrnou zložkou mnohých enzýmov, ako glutathion peroxidáza, tioredoxín reduktáza a deiodináza. Tieto enzýmy hrajú dôležitú úlohu v antioxidačii organizmu,

reprodukcii, funkcii svalov a prevencii vzniku nádorov. Dlhodobá deprivácia selénu spôsobuje nekrotizujúcu kardiomyopatiu, periférnu myopatiu, znížený svalový tonus, anémiu atď. (prevzaté z MEHDI a kol. 2013). Súčasné štúdie poukazujú na využitie selénu v prevencii a liečbe nádorových ochorení, stále však nie je jasné, aká dávka selénu je terapeutická a aká už toxická (LEDESMA a kol. 2011). Rôzne aspekty metabolizmu selénu v ľudskom organizme sú neznáme (MEHDI a kol. 2013).

RNDr. Schierovou, PhD., bola v roku 2009 pripravená mikroarrayová analýza porovnávajúca génovú expresiu v kultúre rastúcej na selénane a na GM, resp. génová expresia vrásčitých a polovrásčitých kolónií starých 3, 4 a 6 dní. Ukázalo sa, že časť génov so zmenenou expresiou v prítomnosti selénanu je závislá na transkripčnom faktore Hac1p. Hoci úroveň jeho expresie bola porovnateľná u oboch kultúr, bol jedným z kandidátnych génov s účinkom na morfogénézu a vývoj kolónií.

6.2 Vplyv génu *HAC1* a jeho homológov na morfogénézu húb

Pri štúdiu funkcie Hac1p u kvasinky *S. cerevisiae* a ďalších húb sa zistilo, že gén *HAC1* a jeho ortológy nie sú za normálnych rastových podmienok esenciálne pre viabilitu, ale zohrávajú ústrednú úlohu pri aktivácii bunkovej odpovede na prítomnosť nezbalených proteínov (UPR) pri strese v ER (COX a WALTER 1996, SALOHEIMO a kol. 2003). Stres v ER môže vznikáť v dôsledku zvýšenej teploty, pôsobením chemických látok, mutáciami v génoch kódujúcich sekretorické proteíny, pri zvýšenej expresii extracelulárnych proteínov, ktorá vedie ku akumulácii nezbalených proteínov v ER a pod. (prevzaté z KAUFMAN 1999).

U prírodných kmeňov PORT i BR-F-Flo11p-GFP sa však ukázalo, že Hac1p musí plniť určitú funkciu i za nestresových podmienok a delécia génu *HAC1* je spojená so stratou schopnosti tvoriť štruktúrované kolónie. Kmeň s deléciou génu *HAC1* odvodený od kmeňa PORT nie je schopný vytvárať štruktúrované kolónie na médiu so selénanom a na GM i GM+0,05 mM Se vytvára hladké kolónie. Kmene s deléciou génu *HAC1* odvodené od rodičovského kmeňa BR-F-Flo11p-GFP tvoria do 5. dňa vývoja na GM prevažne hladké kolónie, od 6.-7. dňa vývoja získavajú heterogénny morfortyp, sú polovrásčité a rastú výrazne do plochy. Tieto kolónie boli morfologicky veľmi podobné kolóniám haploidného laboratórneho kmeňa Σ Sh-*hac1* Δ , ktoré vytvárajú na GM 2 morfortypy: kolónie hladké (resp. s jemnou centrálnou vrásčitou kresbou) a kolónie polovrásčité. Pre kmene s deléciou génu *HAC1* je typické, že nerastú vo vertikálnom smere a majú spomalený vegetatívny rast.

Deléciou génu *HAC1* u laboratórneho kmeňa *S. cerevisiae* BY4742, ktorý tvorí na GM hladké kolónie, boli získané klony, ktoré sa nelíšili od rodičovského kmeňa veľkosťou kolónií

ani rýchlosťou rastu. Tak sa potvrdil vplyv Hac1p iba na morfogénzu štruktúrovaných kvasinkových kolónií.

V nedávnej dobe sa objavili štúdie popisujúce fenotypové zmeny defektných mutant *hac1Δ* za nestresových podmienok u viacerých druhov húb. *Aspergillus fumigatus*, termotolerantná huba žijúca v komposte schopná rastu do teploty 60 °C (BHABHRA a ASKEW 2005), pri delícii génu *HACA* a teplote 45 °C nie je schopná udržať integritu bunkovej steny. Na špičkách i pozdĺž hýf u nej dochádza ku vylietaniu cytoplazmy, čo je pravdepodobne spôsobené oslabením bunkovej steny pri jej prestavbe (RICHIE a kol. 2009). Významná úloha génu *AbHACA* (funkčný homológ *HAC1* *S. cerevisiae*) bola popísaná i u nekrotrofnej huby *Alternaria brassicicola*, ktorá vyvoláva vznik čiernych škvŕn na rôznych druhoch rastlín z čeľade kapustovité. Kmene s deléciou génu *AbHACA* vykazujú abnormálnu morfológiu a nedostatočné vetvenie hýf, poškodenie bunkovej steny a zníženie sekrečnej kapacity (JOUBERT a kol. 2011).

Proteín Hac1p, funkčný homológ Hac1p *Saccharomyces cerevisiae*, zohráva kľúčovú úlohu i v regulácii morfológie patogénnej kvasinky *Candida albicans* - reguluje transkripciu génov, ktoré sú prinajmenšom za stresových podmienok, zahrnuté v biosyntéze bunkovej steny a v procesoch vezikulárneho transportu. Po stimulácii sérom, ktorý indukuje dimorfnú tranzíciu a tvorbu hýf u *C. albicans*, bola u kmeňov s deléciou génu *HAC1* redukovaná tvorba hýf z pôvodných 80 % na 14 % a priamo úmerne tejto hodnote sa zvýšil podiel pseudohyálnych a pučiacich kvasinkových buniek. Filamentárne bunky kmeňa *hac1Δ* vytvárali menšie a menej asociované zhluky (WIMALASENA a kol. 2008).

S obdobnou zmenou morfológie buniek a stratou schopnosti flokulovať sa stretávame u kmeňov *S. cerevisiae* s deléciou génu *HAC1* odvodených od kmeňov PORT a BR-F-Flo11p-GFP. Oba rodičovské kmene vytvárajú pri kultivácii na príslušnom médiu (kmeň PORT na GM+0,05 mM Se, kmeň BR-F-Flo11p-GFP na GM) bunky predĺžené, vzájomne pevne adherujúce a tvoriace zhluky. Kmeň PORT- *hac1Δ* vytvára na médiu so selénom vzájomne neasociované, guľovité a oválne bunky. Kmeň s deléciou génu *HAC1* odvodený od kmeňa BR-F-Flo11p-GFP vytvára na GM bunky predĺžené, zväčšené a neadherujúce. Kvantitatívne som však veľkosť buniek kmeňa *hac1Δ* v porovnaní s rodičovským kmeňom BR-F-Flo11p-GFP neurčovala, ide len o záver z mikroskopického pozorovania. Zväčšené bunky kmeňa *hac1Δ* by mohli poukazovať na problémy s bunkovým delením alebo reguláciou bunkového cyklu. Prítomnosť predĺžených a zväčšených buniek bola pozorovaná i kmeňov *Alternaria brassicicola* s deléciou génu *AbHACA* (JOUBERT a kol. 2011).

6.3 *HAC1* a adhezíny

Kmene s deléciou génu *HAC1* majú znížený výskyt adhezínov na bunkovom povrchu.

Znížená schopnosť medzibunkovej adhézie, napr. u filamentárnych buniek kmeňa *hac1Δ C. albicans* (WIMALASENA a kol. 2008) a kmeňov *hac1Δ* odvodených od PORT a BR-F-Flo11p-GFP na príslušnom médiu (kmeň PORT na GM+0,05 mM Se, kmeň BR-F-Flo11p-GFP na GM), je pravdepodobne spôsobená vplyvom Hac1p na produkciu povrchových adhezínov. Počas stresu v ER u *C. albicans* dochádza ku zvýšenej expresii génov kódujúcich adhezíny (*ALS4*, *ALS5*, *ALS12*, *ALS10*; HOYER 2001) a proteínové manozyltransferázy, ktoré ovplyvňujú funkciu adhezínov *C. albicans* (*PMT1*, *PMT2*, *PMT4-6*; TIMPEL a kol. 1998, TIMPEL a kol. 2000). Inaktivácia *HAC1* má tak vplyv na funkciu adhezínov na bunkovom povrchu. Za nestresových podmienok bolo možné porovnať expresiu génov kódujúcich adhezíny iba u kvasinkových buniek *C. albicans*. Expresia žiadneho z génov *ALS* v závislosti od Hac1p pozorovaná nebola (WIMALASENA a kol. 2008).

U kvasinky *S. cerevisiae* je pre adhéziu buniek k substrátu a ostatným bunkám nevyhnutný flokulín Flo11p. Expresia génu *FLO11* je regulovaná z najdlhšieho promótoru popísaného u *S. cerevisiae* (3 kbp), je veľmi komplexná a ovplyvnená rôznymi dráhami. Jeho expresia zároveň koreluje s morfológiou kolónií – najvyššia expresia génu *FLO11* je u najvýraznejšie štruktúrovaných kolónií a jeho delécia vedie ku strate schopnosti tvoriť vrásčité kolónie (ŠŤOVÍČEK a kol. 2010). Pri využití série rôzne modifikovaných promótorov v „upstream“ oblasti génu *FLO11* sa preukázala odlišná úroveň jeho expresie, čo viedlo ku odlišnej morfogenéze kolónií *S. cerevisiae* (VOORDECKERS a kol. 2012).

U 3 a 5 dní starých buniek kmeňov s deléciou génu *HAC1* odvodených od rodičovského kmeňa BR-F-Flo11p-GFP bol pozorovaný iba slabý fluorescenčný signál Flo11p-GFP. Neprítomnosť fluorescenčného signálu Flo11p-GFP bola preukázaná i pomocou spektrofotometra u 4 dní starých monokolónií. To by mohlo poukazovať na to, že nielen hladina mRNA *FLO11* (ŠŤOVÍČEK a kol. 2010), ale i hladina translatovaného Flo11p koreluje s morfotypom kolónií - počas 3.-5. dňa vývoja sú kolónie kmeňov BR-F-*hac1Δ*/Flo11p-GFP prevažne hladké. To predpokladá určitý typ vzájomnej regulácie a interakcie medzi génmi *FLO11* a *HAC1* na transkripčnej, posttranskripčnej či posttranslačnej úrovni. Presný mechanizmus príp. posttranskripčných či posttranslačných regulácií génu *FLO11* u *S. cerevisiae* nebol doteraz popísaný. Alternatívne, Hac1p by mohol regulovať expresiu niektorého z mnohých transkripčných faktorov, ktoré ovplyvňujú expresiu *FLO11*.

Pri strese v ER u *S. cerevisiae*, dochádza podobne ako u *C. albicans*, ku zvýšeniu expresie génov kódujúcich proteíny potrebné pre glykozyláciu, posttranslačné modifikácie proteínov, proteíny vezikulárneho transportu, proteíny biosyntézy bunkovej steny a sekretorické proteíny (TRAVERS a kol. 2000, KIMATA a kol. 2005, WIMALASENA a kol. 2008). Na základe rovnakého mechanizmu aktivácie UPR a prítomnosti funkčne homológnych proteínov Hac1p u *C. albicans* a *S. cerevisiae* by sme mohli predpokladať analogickú funkciu Hac1p u oboch týchto kvasiniek i za nestresových podmienok. Za nestresových podmienok vedie delícia génu *HAC1* *C. albicans* k inhibícii tvorby hýf a zhlukov buniek pravdepodobne kvôli inhibícii vezikulárneho transportu. Ten je nevyhnutný pre polarizovaný rast, adherovanie buniek a expresiu niektorých génov spojených so sekréciou (WIMALASENA a kol. 2008).

Teoreticky je možné, že zostrih mRNA *HAC1* nie je nevyhnutný pre sprostredkovanie efektu *HAC1* na polarizovaný rast. Autori WIMALASENA a kol. (2008) sa však prikláňajú k alternatíve, že i za nestresových podmienok je udržiavaná bazálna hladina zostrihnutej mRNA *HAC1*, čo umožňuje polarizovaný rast a vezikulárny transport adhezínov do bunkovej steny.

U *S. cerevisiae* je UPR aktivovaná i za nestresových podmienok pri vegetatívnom raste a zvyšuje efektivitu zbaľovania proteínov v lumene ER (SPEAR a NG 2001). Pri delícii génu *HAC1* je UPR potlačená, čo môže viesť k narušeniu procesov súvisiacich so sekrečnou dráhou, a to posttranslačných modifikácií proteínov, vezikulárneho transportu, biogenézy bunkovej steny a sekrécie proteínov do extracelulárneho priestoru. To by mohlo vysvetliť i veľmi nízku úroveň fluorescenčného signálu Flo11p-GFP v raných štádiách vývoja kmeňov BR-F-*hac1Δ*/Flo11p-GFP. Proteín Flo11p musí byť posttranslačne modifikovaný glykozyláciou (LO a DRANGINIS 1998) a v rámci vezikulárneho transportu sa dostáva do bunkovej steny. Tieto procesy sú pravdepodobne za nestresových podmienok pri delícii génu *HAC1* narušené.

Adhezíny podmieňujú filamentárny rast, medzibunkový kontakt i kontakt s pevným podkladom (LAMBRECHTS a kol. 1996). Do kultivačného média s 3% glycerolom zarastal kmeň PORT-*hac1Δ* výrazne menej než rodičovský kmeň. Do média so selénanom vrastal kmeň PORT-*hac1Δ*, podobne ako rodičovský kmeň, pevnejšie než do GM, čo poukazuje na pozitívne pôsobenie selénanu na bunkovú adhezivitu a vrastanie do média. Vzor vrastania sa však významne líšil – u kmeňa s deléciou génu *HAC1* bola pozorovaná veľká centrálna, pomerne pevne vrastajúcu časť a menej pevne vrastajúci periférny prstenec. Rodičovský kmeň PORT tvoril na médiu so selénanom kyticovitú štruktúru s nepravidelným okrajom,

veľmi podobnú stopu kolónií kmeňa BR-F-Flo11p-GFP na GM. Kmeň BR-F-*hac1Δ*/ Flo11p-GFP zarastal do GM menej a jeho stopa v agare bola menej štruktúrovaná. Podpovrchová časť kmeňa BR-F-Flo11p-GFP bola na okrajoch tvorená pseudohýfami, ktoré umožnili pevné vrastanie do média. Okraje podpovrchovej časti kolónií kmeňa *hac1Δ* boli tvorené guľatými a oválnymi bunkami, pseudohyfálne vlákna pozorované neboli. To opäť poukazuje na nízku bazálnu aktivitu UPR, inhibovaný transport adhezínov do bunkovej steny a neschopnosť polarizovaného rastu.

6.4 *HAC1*, virulencia a sekrécia proteínov

Delécia génu kódujúceho funkčný homológ *HAC1* *S. cerevisiae* u patogénnych húb *C. albicans*, *A. brassicicola* a *A. fumigatus* vedie ku úplnej strate ich virulencie. Ako už bolo spomínané, u *C. albicans* inaktivácia Hac1p pravdepodobne potláča integritu bunkovej steny, znemožňuje polarizovaný rast a tak tvorbu hýf (WIMALASENA a kol. 2008). Filamentárne huby *A. brassicicola* a *A. fumigatus* pri penetrácii do hostiteľského organizmu a za účelom získavania živín sekretujú veľké množstvo extracelulárnych proteínov. Delécia *AbHACA* u *A. brassicicola* a *HACA* u *A. fumigatus* vedie ku inaktivácii UPR, a tak ku i zníženiu úrovne sekrécie proteínov, vrátane sekretovaných patogénnych faktorov. Za takýchto podmienok je UPR nevyhnutná pre udržanie homeostázy v ER (RICHIE a kol. 2009, JOUBERT a kol. 2011). Pre tvorbu štruktúrovaných kolónií „divokých“ kmeňov *S. cerevisiae* je okrem adhézie buniek k povrchom esenciálna i produkcia extracelulárnej matrix (VÁCHOVÁ a kol. 2011). Delécia génu *HAC1* u *S. cerevisiae* môže viesť ku zníženiu množstva sekretovaných proteínov a ďalších zložiek, ktoré sú súčasťou ECM.

K úplnej strate virulencie filamentárnej huby *Cryptococcus neoformans* došlo pri delécii génu *HXL1* a *IRE1*. Hxl1p však nie je ortológom proteínov Hac1p/Xbp1p, no pri rôznych stresových podnetoch sa UPR aktivuje jeho nekonvenčným zostrihom pomocou Ire1p. *ire1* mutanty majú defekt v biosyntéze antifagotického puzdra, významného virulentného faktora. Biosyntéza puzdra u *hxl1* kmeňa sa však od rodičovského kmeňa nelíšila. To zrejme súvisí s tým, že fyziologická funkcia Ire1p môže byť na Hxl1p závislá i nezávislá a tvorba puzdra je Hxl1p nezávislá. U *C. neoformans* sa UPR podieľa na kontrole sekrécie virulentných faktorov, degradačných enzýmov a transporte veziklov s polysacharidmi (CHEON a kol. 2011).

U patogénnych druhov húb je UPR esenciálna pre virulenciu, a preto je jej štúdium cieľom antimykotickej terapie.

UPR sa aktivuje nielen pri strese v ER, ale i pri normálnych rastových podmienkach pri zvýšenej požiadavke bunky sekretovať proteíny. UPR je indukovaná napr. v cicavčích B lymfocytoch pri stimulácii sekrécie protilátok (GASS a kol. 2002). UPR chráni sekretorické bunky pred stresom v ER, ktorý by vznikol pri aktivácii intenzívnej sekrécie (REIMOLD a kol. 2000, SCHEUNER a kol. 2001, IWAKOSHI a kol. 2003). Nevyhnutnosť správnej funkcie UPR sa preukázala i počas embryonálneho vývinu myši. Myši s deléciou génu *XBPI* vykazovali závažnú hypopláziu pečene, ktorá spôsobila vysokú letalitu raných embryí (REIMOLD a kol. 2000). Podobne ako plazmatické bunky a β bunky pankreasu, aj hepatocyty patria medzi sekrečné bunky sekretujúce lipoproteínové vezikly, ktoré transportujú cholesterol a triglyceridy k ostatným tkanivám. Napriek tomu je u myši s deléciou génu *XBPI* udržiavaná normálna hladina apolipoproteínu B. Syntéza lipidov je však význame redukovaná a vedie k nízkej hladine plazmatických lipidov (LEE a kol. 2008a).

Postupne sa tak ukázalo, že UPR nezohráva úlohu iba pri kontrole správneho zbaľovania proteínov, ale je v bunke zapojená do širokej škály fyziologických procesov (SAYEED a NG 2005). UPR je napr. taktiež spojená s cytokínézou (BICKNELL a kol. 2007), autofágiou (BERNALES a kol. 2006), pseudohyálnym rastom (SCHRODER a kol. 2000) či udržiavaním membránovej homeostázy (COX a kol. 1997).

Zmeny v aktivácii UPR sme chceli sledovať pomocou C-terminálnej fúzie Sec61p s GFP u kmeňov odvodených od rodičovského kmeňa PORT. Gén *SEC61* obsahuje vo svojej promótorovej sekvencii UPRE a teda je pozitívne regulovaný TF Hac1p (TRAVERS a kol. 2000). Pomocou DTT gradientového testu sme ukázali, že kmeň *hac1Δ* nie je schopný zvýšiť hladinu Sec61p-GFP v prítomnosti DTT. Pomocou imunodetekcie sme však nezistili rozdiely v hladine Sec61p-GFP u všetkých testovaných kmeňov v priebehu 4.-7. dňa kultivácie. Z výsledkov imunodetekcie Sec61p-GFP vyplýva, že behom 7 dní kultivácie na GM alebo GM+0,05 mM Se nedochádza ku aktivácii UPR.

Rastové analýzy však preukázali, že *HAC1* efekt na rast má. Síce sme rozdiely v aktivácii UPR pomocou imunodetekcie nezistili, aktivácia UPR môže byť krátkodobá a nemuseli sme ju detekovať. UPR je proces regulovaný a tlmený a v našich odberových časoch sa nemusel vôbec prejaviť.

Pri meraniach pomocou externej sondy spektrofluorimetra boli zistené rozdiely v intenzite fluorescenčného signálu Sec61p-GFP. Pravdepodobne boli spôsobené rozdielmi v morfológiách a odlišným vertikálnym a horizontálnym charakterom rastu monokolónií jednotlivých kmeňov na rôznych médiách.

6.5 Efekt zvýšenej expresie génu *HAC1* a jeho homológov u húb

Konštitutívna expresia génu *HAC1* sa u kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis* či *Hansenula polymorpha* (prevzaté z TAE-HEE a kol. 2012) v literatúre popisuje predovšetkým v súvislosti s produkciou heterológnych proteínov, ktorá je podmienená schopnosťou zbaľovať a sekretovať cieľové proteíny cez sekrečnú dráhu (SARRAMEGNA a kol. 2003, BÁEZ a kol. 2005). Produkcia veľkého množstva rekombinantných proteínov je dôležitá vo farmaceutickom, biomedicínskom či biotechnologickom priemysle (GUERFAL a kol. 2010). K aktivácii syntézy rekombinantného proteínu však dochádza za podmienok, kedy má gén *HAC1* zostrihnutú sekvenciu bez intrónu (*HAC1ⁱ*) a je exprimovaný z plazmidu pod kontrolou silného promótoru (VALKONEN a kol. 2002, GASSER a kol. 2007, TAE-HEE a kol. 2012). Za týchto podmienok dochádza ku zvýšenej expresii rekombinantných proteínov, u kvasinky *S. cerevisiae* napr. k 4- a 1,6-násobnému zvýšeniu intracelulárnej a sekretovanej hladiny sledovaného ľudského faktora zrážanlivosti LK8 (TAE-HEE a kol. 2012).

U kmeňov *S. cerevisiae* PORT i BR-F-Flo11p-GFP s konštitutívnou expresiou génu *HAC1* sa efekt expresie pod kontrolou silného promótoru TEF neprejavil. Tieto kmene zjavne nezmenili svoju morfológiu, charakter a rýchlosť rastu, ani hladinu produkovaného Sec61p-GFP (u kmeňov odvodených od PORT) či Flo11p-GFP (u kmeňov odvodených od BR-F-Flo11p-GFP) oproti rodičovským kmeňom. Gén *HAC1* bol však u kmeňov s jeho konštitutívnou expresiou exprimovaný priamo z genómu, kde promótor TEF nahradil prirodzený promótor. Promótor TEF sa vždy inzertoval do oblasti promótoru iba jednej alely génu. Nepodarilo sa získať žiaden klon s konštitutívnou expresiou génu *HAC1* z oboch alel. Zároveň gén *HAC1* nemal zo svojej sekvencie odstránenú intrónovú sekvenciu, ktorá po transkripcii mRNA *HAC1^u* bráni translácii (CHAPMAN a WALTER 1997, RUEGSEGGER a kol. 2001). Z našich pokusov vyplýva, že zvýšená hladina mRNA *HAC1* (experimentálne neoverované) nie je rozhodujúcim faktorom pre zmenu morfológie kolónií.

6.6 Citlivosť rôznych druhov húb s deléciou génu *HAC1* voči inhibítorom

Pri strese v ER u *S. cerevisiae* zvýši Hac1p expresiu stoviek génov zaist'ujúcich zvýšenie kapacity ER a zníženie hladiny nesprávne zbalených proteínov. Jedným z prejavov UPR je zvýšená syntéza fosfolipidov a zväčšenie povrchu membrán ER (TRAVERS a kol. 2000, BRICKNER a WALTER 2004, SCHUCK a kol. 2009).

Schopnosť rastu a vyrovnanie sa so stresom v ER sa u rôznych druhov kvasiniek s deléciou génu *HAC1* alebo *IRE1* testuje pri ich kultivácii v prítomnosti rôznych induktorov

stresu v ER, ktoré narúšajú zbaľovanie proteínov v lumene ER. Najčastejšie sa využíva tunikamycín inhibujúci N-glykozyláciu a DTT, ktorý bráni tvorbe disulfidických mostíkov. My sme v tejto práci využili ako induktora UPR aj kadmium a meď, ktoré vyvolávajú oxidatívny stres, peroxidáciu lipidov, oxidáciu a denaturáciu proteínov, poškodenie DNA, čo nakoniec vedie ku apoptóze (HALLIWELL a GUTTERIDGE 1984, PENA a kol. 1998, BAUDOUIN-CORNU a LABARRE 2006, VALKO a kol. 2006).

Stres v ER vyvoláva i stres v bunkovej stene a naopak. Pri strese v ER sa nesprávne zbalené, či posttranslačne modifikované proteíny dostávajú sekrečnou dráhou do bunkovej steny, čo narúša jej integritu a biogénu (SCRIMALE a kol. 2009). Pri vzniku stresu v bunkovej stene je UPR aktivovaná dráhou CWI-MAPK, ktorá indukuje gény podieľajúce sa na obnove bunkovej steny, ale i UPR (CHEN a kol. 2005, NUNEZ a kol. 2008, SCRIMALE a kol. 2009). Citlivosť kmeňov s deléciou génu *HAC1* sme preto testovali i v prítomnosti agens narúšajúcom syntézu chitínu a glukánu v bunkovej stene ako Congo Red, Calcofluor White (RAM a KLIS 2006) a 2-deoxy-D-glukóza. 2-deoxy-D-glukóza narúša metabolické procesy zahrnuté v biosyntéze bunkovej steny, vrátane syntézy β -1,3-glukánu (BIELY a kol. 1971, KRÁTKY a kol. 1975, MOORE 1981).

Kmene s deléciou a zvýšenou expresiou génu *HAC1* odvodené od oboch rodičovských kmeňov odpovedali na prítomnosť inhibítorov obdobne. Pri DTT teste sa prejavila ich vysoká citlivosť k najvyššej koncentrácii DTT. Kmene so zvýšenou expresiou génu *HAC1* boli voči najvyššej koncentrácii DTT rezistentné. Kmeň PORT- *hac1Δ* mal zníženú rezistenciu voči 0,3 mM kadmium. Pri rovnakej koncentrácii kadmia nerastie na YD ani kmeň *hac1Δ* ani rodičovský kmeň BR-F-Flo11p-GFP, čo poukazuje na jeden z rozdielov v citlivosti na inhibítory u oboch rodičovských kmeňov s odlišným pôvodom a genetickým pozadím. Znížená citlivosť kmeňov *hac1Δ* voči medi sa neprejavila ani u kmeňov odvodených od PORT ani od kmeňov odvodených od kmeňa BR-F-Flo11p-GFP, u ktorého však bola použitá 3× nižšia koncentrácia. Kvapkové testy ďalej preukázali zníženú rezistenciu delečných kmeňov *hac1Δ* voči 2-deoxy-D-glukóze, Calcofluor White a Congo Red. Rezistencia kmeňov so zvýšenou expresiou génu *HAC1* bola porovnateľná s príslušným rodičovským kmeňom, s výnimkou kmeňa PORT-P_{TEF}-*HAC1* s mierne zníženú rezistenciu voči 2-deoxy-D-glukóze.

Výsledky inhibítorových testov prírodných kmeňov *Saccharomyces cerevisiae* s deléciou génu *HAC1* sú konzistentné so situáciou u patogénnych druhov húb ako *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* a *Alternaria brassicicola* pri delícii funkčného homológa *HAC1*. U patogénnych húb je aktivácia UPR nevyhnutná pre potlačenie nepriaznivých podmienok v hostiteľskom organizme, ako je napr. nízka

dostupnosť kyslíka a pod. (WIMALASENA a kol. 2008, RICHIE a kol. 2009, CHEON a kol. 2011, JOUBERT a kol. 2011).

Mutantné kmene s deléciou homológa génu *HAC1* u húb *C. albicans* a *A. fumigatus* vykazujú rastové defekty v prítomnosti induktorov UPR (DTT, tunikamycín) a agens narúšajúcom bunkovú stenu (Congo Red, Calcofluor White, kaspofungín) (WIMALASENA a kol. 2008, RICHIE a kol. 2009). Citlivosť na Congo Red a Calcofluor White je typická i pre kmene *C. albicans* s deficientnou glykozyláciou (BATES a kol. 2005, RAM a KLIS 2006). U kmeňa *A. fumigatus* s deléciou génu *HACA* indukuje Calcofluor White priame narušenie bunkovej steny, apikálnu lýzu buniek a redukuje hyfálny rast (RICHIE a kol. 2009). Analogická odpoveď pri strese v ER bola pozorovaná i u defektných kmeňov *hxl1* a *ire1* *C. neoformans* (Hxl1p však nie je ortológom proteínu Hac1p *S. cerevisiae*) - sú hypersenzitívne na stres v ER vyvolanom induktormi UPR a sú citlivé na agens destabilizujúce bunkovú stenu (CHEON a kol. 2011). *A. brassicicola* má pri delícii génu *AbHACA* zníženú rezistenciu voči DTT i Congo Red, no prekvapivo nie je citlivá na prítomnosť Calcofluor White v médiu. To by predpokladalo vplyv AbHacAp hlavne na syntézu a zastúpenie glukánu v bunkovej stene (JOUBERT a kol. 2011).

Kmene s deléciou génu *HAC1* odvodené od kmeňov *S. cerevisiae* PORT i BR-F-Flo11p-GFP mali mierne zníženú rezistenciu voči teplote 37 °C pri kultivácii na GM. Mutanty *hxl1* a *ire1* u *C. neoformans* vykazujú extrémne rastové defekty pri fyziologickej teplote 37 °C a sú avirulentné u myší. Presná príčina hypertermosenzitivity nie je známa (CHEON a kol. 2011), ale dá sa predpokladať na základe transkriptomického analýzy *C. neoformans* rastúcom pri 37 °C, kedy dochádza k indukcii transkripcie génov stresovej odpovede, integrity bunkovej steny, filamentárneho rastu, oxidatívneho metabolizmu, cieľovania proteínov pri membránovom transporte, N-/O- glykozylácie a metabolizmu mastných kyselín (KRAUS a kol. 2004, PERFECT 2006, ROSA e SILVA a kol. 2008). Obdobne mutanty *hacAΔ* u *A. fumigatus* majú významne zníženú termotoleranciu (RICHIE a kol. 2009).

Ukázalo sa, že Hac1p nie je dôležitý len pri odpovedi na indukovaný stres v ER, ale zohráva významnú úlohu i počas vegetatívneho rastu za nestresových podmienok.

Ďalší výskum by mal viesť k odhaleniu mechanizmu pôsobenia selénanu sodného a regulácie *HAC1* za nestresových podmienok na morfogénzu kvasinkových kolónií.

V najbližšej dobe sa budeme snažiť pomocou Northern blot analýzy zistiť, kedy behom vývoja kvasinkových kolónií dochádza k zostrihu mRNA *HAC1* (1). I keď sme

nezistili rozdiely v aktivácii UPR pomocou imunodetekcie Sec61p-GFP v priebehu 4.-7. dňa kultivácie kmeňov na GM a GM+0,05 mM Se, rastové analýzy poukázali na morfogenetický účinok génu *HAC1* a predpokladajú krátkodobú aktiváciu UPR i za nestresových podmienok. Northern blot analýza bude využitá i pri detekcii zostrihutej formy mRNA *HAC1* po pôsobení DTT, induktora stresu v ER, kde by malo dôjsť k markantnému zostrihu (2).

Výsledky získané zo spektrofluorometrického merania Sec61p-GFP v kolóniách po pôsobení koncentračného gradientu DTT by sme radi overili pomocou imunodetekcie a taktiež mikroskopickým sledovaním buniek z týchto kolónií (3). Tu očakávame zvýšenie hladiny Sec61p-GFP u rodičovských kmeňov a kmeňov so zvýšenou expresiou génu *HAC1*. U mutanty *hac1Δ* by sa efekt zvýšenia Sec61p-GFP nemal prejaviť, pretože ku aktivácii UPR nedochádza a tak Hac1p nemôže pozitívne ovplyvniť expresiu génu *SEC61*.

Kmene s deléciou génu *HAC1* majú zníženú schopnosť adhézie k bunkám i podkladu, čo predpokladá vplyv Hac1p na produkciu povrchových adhezínov, vrátane Flo11p nevyhnutného pre tvorbu štruktúrovaných kolónií. Sledovaním exprese *FLO11* pomocou Northern a Western blot analýz u buniek rodičovského kmeňa a kmeňa s deléciou *HAC1* by sme chceli určiť vzájomný vzťah medzi génmi *FLO11* a *HAC1* (4).

Do úvahy pripadá i vykonanie mikroarrayovej analýzy porovnávajúcej génovú expresiu v kultúre kmeňov *hac1Δ* a príslušného rodičovského kmeňa. Táto mikroarrayová analýza však nesie radu otáznikov a príp. problémov spôsobených nielen rozdielmi súvisiacimi s deléciou génu *HAC1*, ale i posunutou rastovou fázou (5).

Rozdiely v zložení intracelulárnych proteínov kmeňov na GM a GM+0,05 mM Se plánujeme detailne analyzovať pomocou hmotnostnej spektrometrie. Štúdium zmien proteínového „patternu“ kmeňov závislých na type kultivačného média by mohlo odhaliť mechanizmy pôsobenia selénanu sodného na morfogézu kvasinkových kolónií (6).

7 Súhrn

- U *Saccharomyces cerevisiae* je bazálna hladina UPR udržiavaná i za nestresových podmienok počas vegetatívneho rastu. Prostredníctvom proteínu Hac1p sú tak pravdepodobne ovplyvnené procesy spojené so sekrečnou dráhou, ako vezikulárny transport, syntéza komponent bunkovej steny a jej biogenéza a sekrécia proteínov. To má pravdepodobne vplyv na vývoj, morfogénu a rýchlosť rastu kolónií „divokých“ kmeňov *Saccharomyces cerevisiae*.
- Delécia génu *HAC1* znížila vrásčitosť štruktúrovaných kolónií *Saccharomyces cerevisiae* PORT a BR-F-Flo11p-GFP. Kmene s deléciou génu *HAC1* odvodené od kmeňa PORT nie sú schopné vytvárať štruktúrované kolónie v prítomnosti 0,05 mmol selénanu sodného a na GM i na médiu so selénanom vytvárajú hladké kolónie. Kmene s deléciou génu *HAC1* odvodené od kmeňa BR-F-Flo11p-GFP tvoria do 5. dňa vývoja na GM prevažne hladké kolónie, od 6.-7. dňa vývoja získavajú heterogénny morfortyp, sú polovrásčité a rastú výrazne do plochy.
- Kmene s deléciou génu *HAC1* mali spomalený vegetatívny rast, nerástli vo vertikálnom rozmere, mali zníženú adhéziu / zarastanie buniek do agaru a zníženú tvorbu zhlukov. Delečné kmene ďalej vykazovali zvýšenú citlivosť voči induktorom stresu v ER, agens narúšajúcom biosyntézu a integritu bunkovej steny a voči teplote 37 °C na GM.
- U kmeňov s deléciou génu *HAC1* odvodených od rodičovského kmeňa BR-F-Flo11p-GFP bol pozorovaný iba slabý fluorescenčný signál Flo11p-GFP. To môže poukazovať na narušenie posttranslačných modifikácií a vezikulárneho transportu proteínov do bunkovej steny, vrátane adhezínu Flo11p. Alternatívne, Hac1p by mohol regulovať expresiu niektorého z mnohých transkripčných faktorov, ktoré ovplyvňujú expresiu *FLO11*.
- Hladina Sec61p-GFP sa medzi kmeňmi odvodenými od kmeňa PORT v čase a pri rôznych kultivačných podmienkach nemenila a je pravdepodobné, že behom kultivácie nedochádza k výraznej aktivácii UPR.

- Zvýšená expresia génu *HAC1* nemala zrejmy vplyv na morfogézu, vegetatívny rast, citlivosť voči inhibítorom a intenzitu fluorescencie Sec61p-GFP a Flo11p-GFP u kmeňov odvodených od *Saccharomyces cerevisiae* PORT-Sec61p-GFP a BR-F-Flo11p-GFP. Hladina aktívneho proteínu Hac1p je závislá na zostrihu jeho intrónu.

8 Zoznam použitej literatúry

- Ansari, A., Hampsey, M. (2005): A role for the CPF 3'-end processing machinery in RNAP II-dependent gene looping. *Genes & Development* 19: 2969–2978.
- Aragon, T., van Anken, E., Pincus, D., Serafimova, I.M., Korennykh, A.V., Rubio, C.A., Walter, P. (2009): Messenger RNA targeting to endoplasmic reticulum stress signalling sites. *Nature* 457: 736–740.
- Ares, M., Jr., Grate, L., Pauling, M.H. (1999): A handful of intron-containing genes produces the lion's share of yeast mRNA. *RNA* 5: 1138–1139.
- Báez, J., Olsen, D., Polarek, J.W. (2005): Recombinant microbial systems for the production of human collagen and gelatin. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69: 245–252.
- Bates, S., MacCallum, D.M., Bertram, G., Munro, C.A., Hughes, H.B., Buurman, E.T., Brown, A.J., Odds, F.C., Gow N.A. (2005): *Candida albicans* Pmr1p, a secretory pathway P-type $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase, is required for glycosylation and virulence. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 23408–23415.
- Baudouin-Cornu, P., Labarre, J. (2006): Regulation of the cadmium stress response through SCF-like ubiquitin ligases: comparison between *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* and mammalian cells. *Biochimie* 88: 1673–1685.
- Bernales, S., McDonald, K.L., Walter, P. (2006): Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLOS Biology* 4: e423.
- Bhabhra, R., Askew, D.S. (2005): Thermotolerance and virulence of *Aspergillus fumigatus*: role of the fungal nucleolus. *Medical Mycology* 43: Suppl 1S87–93.
- Bicknell, A.A., Babour, A., Federovitch, C.M., Niwa, M. (2007): A novel function in cytokinesis reveals a housekeeping function for the unfolded protein response. *The Journal of Cell Biology* 177:1017–1027.
- Biely, P., Krátky, Z., Kovark, J., Bauer, S. (1971): Effect of 2-deoxyglucose on cell wall formation in *Saccharomyces cerevisiae* and its relation to cell growth inhibition. *Journal of Bacteriology* 107:121–129.
- Blankenship, J.R., Fanning, S., Hamaker, J.J., Mitchell, A.P. (2010): An extensive circuitry for cell wall regulation in *Candida albicans*. *PLoS Pathogens* 6: e1000752.
- Blankenship, J.R., Mitchell, A.P. (2006): How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current Opinion in Microbiology* 9: 588–594.
- Bonilla, M., Cunningham, K.W. (2003): Mitogen-activated protein kinase stimulation of Ca^{2+} signaling is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast. *Molecular Biology of the Cell* 14: 4296–4305.
- Bonilla, M., Nastase, K.K., Cunningham, K.W. (2002): Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress. *EMBO J* 21: 2343–2353.
- Brickner, J.H., Walter, P. (2004): Gene recruitment of the activated INO1 locus to the nuclear membrane. *PLoS Biology* 2: e342.
- Brozmanová, J., Mániková, D., Vlčková, V., Chovanec, M. (2010): Selenium: a double-edged sword for defense and offence in cancer. *Archives of Toxicology* 84: 919–938.
- Bukau, B., Deuerling, E., Pfund, C., Craig, E.A. (2000): Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* 101: 119–122.
- Calderone, R.A. (2002): Taxonomy and biology of *Candida*. In: Calderone, R. (Ed.), *Candida and Candidiasis*. ASM Press: 15–27.
- Clark, M.W., Abelson, J. (1987): The subnuclear localization of tRNA ligase in yeast. *The Journal of Cell Biology* 105: 1515–1526.
- Cox, J.S., Chapman, R.E., Walter, P. (1997): The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane. *Molecular Biology of the Cell* 8:1805–1814.

- Cox, J.S., Shamu, C.E., Walter, P. (1993): Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell* 73: 1197–1206.
- Cox, J.S., Walter, P. (1996): A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell* 87: 391–404.
- Čáp, M., Štěpánek, L., Harant, K., Pálková, Z., Váchová, L. (2012): Cell Differentiation within a Yeast Colony: Metabolic and Regulatory Parallels with a Tumor-Affected Organism. *Molecular Cell* 46: 436–448.
- Deshaies, R.J., Schekman, R. (1987): A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology* 105: 633–645.
- Donlan, R.M., Costerton, J.W. (2002): Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* 15: 167–193.
- Douglas, L.J. (2003): *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology* 11: 30–36.
- El Kaderi, B., Medler, S., Raghunayakula, S., Ansari, A. (2009): Gene looping is conferred by activator-dependent interaction of transcription initiation and termination machineries. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 25015–25025.
- Feng, X., Krishnan, K., Richie, D.L., Aimaniananda, V., Hartl, L., Grahl, N., Powers-Fletcher, M.V., Zhang, M., Fuller, K.K., Nierman, W.C. *et al.* (2011): HacA-independent functions of the ER stress sensor IreA synergize with the canonical UPR to influence virulence traits in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathogens* 7: e1002330.
- Fewell, S.W., Travers, K. J., Weissman, J.S., Brodsky, J.L. (2001): The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Annual Review of Genetics* 35: 149–191.
- Filler, S.G., Sheppard, D.C. (2006): Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. *PLoS Pathogens* 2: e129.
- Fujs, S., Semenik, T., Raspor, P. (2009): The effect of ATP sulphurylase on the prooxidant properties of selenate in yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Food Technology nad Biotechnology* 47: 166–171.
- Furger, A., O’Sullivan, J.M., Binnie, A., Lee, B.A., Proudfoot, N.J. (2002): Promoter proximal splice sites enhance transcription. *Genes & Development* 16: 2792–2799.
- Gass, J.N., Gifford, N.M., Brewer, J.W. (2002): Activation of an unfolded protein response during differentiation of antibody-secreting B cells. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 49047–49054.
- Gasser, B., Sauer, M., Maurer, M., Stadlmayr, G., Mattanovich, D. (2007): Transcriptomics-based identification of novel factors enhancing heterologous protein secretion in yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 6499–6507.
- Gietz, R.D., Woods, R.A. (2002): Transformation of the yeast by the Liac/SS carrier DNA/PEG method. *Methods in Enzymology* 350: 87–96.
- Goldstein, A.L., McCusker, J.H. (1999): Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15: 1541–1553.
- Govind, C.K., Zhang, F., Qiu, H., Hofmeyer, K., Hinnebusch, A.G. (2007): Gcn5 promotes acetylation, eviction, and methylation of nucleosomes in transcribed coding regions. *Molecular Cell* 25: 31–42.
- Gow, N.A.R., Brown, A.J.B., Odds, F.C. (2002): Fungal morphogenesis and host invasion. *Current Opinion in Microbiology* 5: 366–371.
- Grant, P.A., Schieltz, D., Pray-Grant, M.G., Steger, D.J., Reese, J.C., Yates, J.R. 3rd, Workman, J.L. (1998): A subset of TAF(II)s are integral components of the SAGA complex required for nucleosome acetylation and transcriptional stimulation. *Cell* 94: 45–53.
- Gueldener, U., Heinisch, J., Koehler, G.J., Voss, D., Hegemann, J.H. (2002): A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Research* 30: e23.
- Guerfal, M., Ryckaert, S., Jacobs, P.P., Ameloot, P., van Craenenbroeck, K., Derycke, R., Callewaert, N. (2010): The *HAC1* gene from *Pichia pastoris*: characterization and effect of its overexpression on the production of secreted, surface displayed and membrane proteins. *Microbial Cell Factories* 9: 49.
- Guérin, R., Arseneault, G., Dumont, S., Rokeach, L.A. (2008): Calnexin is involved in apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress in the fission yeast. *Molecular Biology of the Cell* 19: 4404–4420.

- Güldener, U., Heck, S., Fiedler, T., Beinhauer, J., Hegemann, J.H. (1996): A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Research* 24: 2519-2524.
- Güldener, U., Münsterkötter, M., Kastenmüller, G., Strack, N., van Helden, J., Lemer, C., Richelles, J., Wodak, S.J., García-Martínez, J., Pérez-Ortín, J.E. *et al.* (2005): CYGD: the Comprehensive Yeast Genome Database. *Nucleic Acids Research* 33: 364–D368.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1984): Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal* 219:1-14.
- Hooks, K.B., Griffiths-Jones, S. (2011): Conserved RNA structures in the non-canonical Hac1/Xbp1 intron. *RNA Biology* 8: 552–556.
- Hoyer, L.L. (2001): The *ALS* gene family of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology* 9: 176-180.
- Chapman, R.E., Walter, P. (1997): Translational attenuation mediated by an mRNA intron. *Current Biology* 7: 850–859.
- Charron, M., Chern, J.Y., Wright, W.W. (2007): The cathepsin L first intron stimulates gene expression in rat sertoli cells. *Biology of Reproduction* 76: 813–824.
- Chen, D., Toone, W.M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N., Bähler, J. (2003): Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Molecular Biology of the Cell* 14: 214–229.
- Chen, Y., Feldman, D.E., Deng, C., Brown, J.A., De Giacomo, A.F., Gaw, A.F., Shi, G., Le, Q.T., Brown, J.M., Koong, A.C. (2005) : Identification of mitogen-activated protein kinase signaling pathways that confer resistance to endoplasmic reticulum stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cancer Research* 3: 669–677.
- Cheon, S.A., Jung, K.W., Chen, Y.L., Heitman, J., Bahn, Y.S., Kang, H.A. (2011): Unique evolution of the UPR pathway with a novel bZIP transcription factor, *Hx11*, for controlling pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathogens* 7: e1002177.
- Cherest, H., Nguyen, N.T., Surdin-Kerjan, Y. (1985): Transcriptional regulation of the *MET3* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 34: 269–281.
- Cho, E.J., Buratowski, S. (1999): Evidence that transcription factor IIB is required for a post-assembly step in transcription initiation. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 25807–25813.
- Iwakoshi, N.N., Lee, A.H., Vallabhajosyula, P., Otipoby, K.L., Rajewsky, K., Glimcher, L.H. (2003): Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor *XBp-1*. *Nature Immunology* 4: 321–329.
- Izquierdo, A., Casas, C., Herrero, E. (2010): Selenite-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*: protective role of glutaredoxins. *Microbiology* 156: 2608–2620.
- Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., Knop, M. (2004): A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* 21: 947 – 962.
- Jedd, G., Richardson, C., Litt, R., Segev, N. (1995): The Ypt1 GTPase is essential for the first two steps of the yeast secretory pathway. *The Journal of Cell Biology* 131: 583–590.
- Johnson, A.E., van Waes, M.A. (1999): The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *The Annual Review of Cell and Developmental Biology* 15:799–842.
- Joubert, A., Simoneau, P., Champion, C., Bataillé-Simoneau, N., Iacomini-Vasilescu, B., Poupard, P., François, J.M., Georgeault, S., Sellier, E., Guillemette, T. (2011): Impact of the unfolded protein response on the pathogenicity of the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola*. *Molecular Microbiology* 79:1305-1324
- Juneau, K., Miranda, M., Hillenmeyer, M.E., Nislow, C., Davis, R.W. (2006): Introns regulate RNA and protein abundance in yeast. *Genetics* 174: 511–518.
- Kalies, K.U., Allan, S., Sergeyenko, T., Kröger, H., Römisch, K. (2005): The protein translocation channel binds proteasomes to the endoplasmic reticulum membrane. *The EMBO Journal* 24: 2284–2293.
- Kaufman, J.R. (1999): Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes & Development* 13: 1211-1233.

- Kawahara, T., Yanagi, H., Yura, T., Mori, K. (1997): Endoplasmic reticulum stress-induced mRNA splicing permits synthesis of transcription factor Hac1p/Ern4p that activates the unfolded protein response. *Molecular biology of the Cell* 8: 1845–1862.
- Kimata, Y., Ishiwata-Kimata, Y., Ito, T., Hirata, A., Suzuki, T., Oikawa, D., Takeuchi, M., Kohno, K. (2007): Two regulatory steps of ER-stress sensor Ire1 involving its cluster formation and interaction with unfolded proteins. *The Journal of Cell Biology* 179:75–86.
- Kimata, Y., Ishiwata-Kimata, Y., Yamada, S., Kohno, K. (2005): Yeast unfolded protein response pathway regulates expression of genes for anti-oxidative stress and for cell surface proteins. *Genes Cells* 11: 59–69.
- Korennykh, A.V., Egea, P.F., Korostelev, A.A., Finer-Moore, J., Zhang, C., Shokat, K.M., Stroud, R.M., Walter, P. (2009): The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1. *Nature* 457: 687–693.
- Koutelou, E., Hirsch, C. L., Dent, S.Y. (2010): Multiple faces of the SAGA complex. *Current Opinion in Cell Biology* 22: 374–382.
- Krátký, Z., Biely, P., Bauer, S. (1975): Mechanism of 2-deoxy-D-glucose inhibition of cell wall polysaccharide and glycoprotein biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* 54:459–467.
- Kraus, P.R., Boily, M.J., Giles, S.S., Stajich, J.E., Allen, A., Cox, G.M., Dietrich, F.S., Perfect, J.R., Heitman, J. (2004): Identification of *Cryptococcus neoformans* temperature-regulated genes with a genomic-DNA microarray. *Eukaryotic Cell* 3: 1249–1260.
- Kuthan, M., Devaux, F., Janderova, B., Slaninova, I., Jacq, C., Palkova, Z. (2003): Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. *Molecular Microbiology* 47: 745–754.
- Kwek, K.Y., Murphy, S., Furger, A., Thomas, B., O’Gorman, W., Kimura, H., Proudfoot, N.J., Akoulitchiev, A. (2012): U1 snRNA associates with TFIIF and regulates transcriptional initiation. *Nature Structural & Molecular Biology* 9: 800–805.
- Lambrechts, M.G., Bauer, F.F., Marmur, J., Pretorius, I.S. (1996): Muc1, a mucin-like protein that is regulated by Mss10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 8419–8424.
- Le Hir, H., Nott, A., Moore, M.J. (2003): How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. *Trends in Biochemical Sciences* 28: 215–220.
- Ledesma, M.C., Jung-Hynes, B., Schmit, T.L., Kumar, R., Mukhtar, H., Ahmad, N. (2011): Selenium and vitamin E for prostate cancer: post-SELECT (Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial) status. *Molecular Medicine* 17: 134–143.
- Lee, A.H., Scapa, E.F., Cohen, D.E., Glimcher, L.H. (2008a): Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor *XBPI*. *Science* 320:1492–1496.
- Lee, K.P., Dey, M., Neculai, D., Cao, C., Dever, T.E., Sicheri, F. (2008b): Structure of the dual enzyme Ire1 reveals the basis for catalysis and regulation in nonconventional RNA splicing. *Cell* 132: 89–100.
- Letavayová, L., Vlasáková, D., Spallholz, J.E., Brozmanová, J., Chovanec, M. (2008): Toxicity and mutagenicity of selenium compounds in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research* 638: 1–10.
- Liu, H., Styles, C.A., Fink, G.R. (1996): *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in *FLO8*, a gene required for filamentous growth. *Genetics* 144: 967–978.
- Lo, W.S., Dranginis, A.M. (1998): The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* 9: 161–171.
- Lynes, E.M., Simmen, T. (2011): Urban planning of the endoplasmic reticulum (ER): how diverse mechanisms segregate the many functions of the ER. *Biochimica et Biophysica Acta* 1813:1893–1905.
- MacNeill, S.A. (2002): Genome sequencing: and then there were six. *Current Biology* 12: R294–296.
- Mandon, E.C., Trueman, S.F., Gilmore, R. (2013): Protein Translocation across the rough endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5.

- Medler, S., Al Husini, N., Raghunayakula, S., Mukundan, B., Aldea, A., Ansari, A. (2011): Evidence for a complex of TFIIB with poly(A) polymerase and cleavage factor I subunits required for gene looping. *The Journal of Biological Chemistry* 286: 33709–33718.
- Mehdi, Y., Hornick, J.L., Istasse, L., Dufrasne, I. (2013): Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. *Molecules* 18: 3292–3311.
- Millar, J.B.A., Buck, V., Wilkinson, M.G. (1995): Pyp1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Genes & Development*. 9:2117–2130.
- Miyazaki, T., Nakayama, H., Nagayoshi, Y., Kakeya, H., Kohno, S. (2013): Dissection of Ire1 functions reveals stress response mechanisms uniquely evolved in *Candida glabrata*. *PLoS Pathogens* 9: e1003160.
- Moabbi, A.M., Agarwal, N., El Kaderi, B., Ansari, A. (2012): Role for gene looping in intron-mediated enhancement of transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:8505–8510
- Moore, D. (1981): Effect of hexose analogs on fungi: Mechanisms of inhibition and resistance. *New Phytologist* 87:487–515.
- Mori, K., Kawahara, T., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T. (1996): Signalling from endoplasmic reticulum to nucleus: transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. *Genes Cells* 1: 803–817.
- Mori, K., Ma, W., Gething, M.J., Sambrook, J. (1993): A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. *Cell* 74: 743–756.
- Mori, K., Ogawa, N., Kawahara, T., Yanagi, H., Yura, T. (1998): Palindrome with spacer of one nucleotide is characteristic of the cis-acting unfolded protein response element in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 9912–9920.
- Mori, K., Sant, A., Kohno, K., Normington, K., Gething, M. J., Sambrook, J. F. (1992): A 22 bp cis-acting element is necessary and sufficient for the induction of the yeast *KAR2* (BiP) gene by unfolded proteins. *The EMBO Journal* 11: 2583–2593
- Mulder, H.J., Saloheimo, M., Penttilä, M., Madrid, S.M. (2004): The transcription factor *HACA* mediates the unfolded protein response in *Aspergillus niger*, and upregulates its own transcription. *Molecular Genetics & Genomics* 271: 130–140.
- Ng, W., Sergeyenko, T., Zeng, N., Brown, J.D., Römisch, K. (2007): Characterization of the proteasome interaction with the Sec61 channel in the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science* 120: 682–691.
- Nilsen, T.W., Graveley, B.R. (2010): Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* 463: 457–463
- Nunez, L.R., Jesch, S.A., Gaspar, M.L., Almaguer, C., Villa-Garcia, M., Ruiz-Noriega, M., Patton-Vogt, J., Henry, S.A. (2008): Cell wall integrity MAPK pathway is essential for lipid homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 34204–34217.
- Pálková, Z. (2004): Multicellular microorganisms: laboratory versus nature. *EMBO reports* 5: 470 – 476.
- Pálková, Z., Váchová, L. (2006): Life within a community: benefit to yeast long-term survival. *FEMS Microbiology Reviews* 30: 806–824.
- Parenteau, J., Durand, M., Véronneau, S., Lacombe, A-A., Morin, G., Guérin, V., Cecez, B., Gervais-Bird, J., Koh, C-S., Brunelle, D. *et al.* (2008): Deletion of many yeast introns reveals a minority of genes that require splicing for function. *Molecular Biology of the Cell*: 19: 1932–1941.
- Pena, M.M.O., Koch, K.A., Thiele, D.J. (1998): Dynamic regulation of copper uptake and detoxification genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 18:2514–2523.
- Perfect, J.R. (2006): *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. *FEMS Yeast Research* 6:463–468.
- Pinson, B., Sagot, I., Daignan-Fornier, B. (2000): Identification of genes affecting selenite toxicity and resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* 36: 679–687.
- Ram, A.F, Klis, F.M. (2006): Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. *Nature Protocols* 1: 2253–2256.

- Reimold, A.M., Etkin, A., Clauss, I., Perkins, A., Friend, D.S., Zhang, J., Horton, H.F., Scott, A., Orkin, S.H., Byrne, M.C. *et al.* (2000): An essential role in liver development for transcription factor *XBP-1*. *Genes & Development* 14:152–157.
- Reynolds, T.B., Fink, G.R. (2011): Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* 291: 878–881.
- Richie, D.L., Hartl, L., Aimaniananda, V., Winters, M.S., Fuller, K.K., Miley, M.D., White, S., McCarthy, J.W., Latgé, J.P., Feldmesser, M., *et al.* (2009): A role for the unfolded protein response (UPR) in virulence and antifungal susceptibility in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathogens* 5: e1000258.
- Robert, F.D., Pokholok, K., Hannett, N.M., Rinaldi, N.J., Chandy, M., Rolfe, A., Workman, J.L., Gifford, D.K., Young, R.A. (2004): Global position and recruitment of HATs and HDACs in the yeast genome. *Molecular Cell* 16: 199–209.
- Ron, D., Walter, P. (2007): Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8: 519–529.
- Rosa e Silva, L.K., Staats, C.C., Goulart, L.S., Morello, L.G., Pelegrinelli Fungaro, M.H., Schrank, A., Vainstein, M.H. (2008): Identification of novel temperature-regulated genes in the human pathogen *Cryptococcus neoformans* using representational difference analysis. *Research in Microbiology* 159: 221–229.
- Rose, A.B. (2008): Intron-mediated regulation of gene expression. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 326: 277–290.
- Rueggsegger, U., Leber, J.H., Walter, P. (2001): Block of HAC1 mRNA translation by long-range base pairing is released by cytoplasmic splicing upon induction of the unfolded protein response. *Cell* 107: 103–114.
- Salin, H., Fardeau, V., Piccini, E., Lelandais, G., Tanty, V., Lemoine, S., Jacq, C., Devaux, F. (2008): Structure and properties of transcriptional networks driving selenite stress response in yeasts. *BMC Genomics* 9: 333.
- Saloheimo, M., Valkonen, M., Penttilä, M. (2003): Activation mechanisms of the *HAC1*-mediated unfolded protein response in filamentous fungi. *Molecular Microbiology* 47: 1149–1161.
- Sarramegna, V., Talmont, R., Demange, P., Milon, A. (2003): Heterologous expression of G-protein-coupled receptors: comparison of expression systems from the standpoint of large-scale production and purification. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60: 1529–1546.
- Sayed, A., Ng, D.T. (2005): Search and destroy: ER quality control and ER-associated protein degradation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 40:75–91.
- Scrimala, T., Didone, L., de Mesy, Bentley, K.L., Krysan, D.J. (2009): The unfolded protein response is induced by the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase signaling cascade and is required for cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* 20: 164–175.
- Shahbazian, M.D., Grunstein, M. (2007): Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annual Review of Biochemistry* 76:75–100.
- Sheff, M.A., Thorn, K.S. (2004): Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 21: 661–670.
- Shiozaki, K., Russell, P. (1995): Cell-cycle control linked to the extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature (London)* 378:739–743.
- Scheuner, D., Song, B., McEwen, E., Liu, C., Laybutt, R., Gillespie, P., Saunders, T., Bonner-Weir, S., Kaufman, R.J. (2001): Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Molecular Cell* 7: 1165–1176.
- Schier, J., Kovař, B. (2013): Simple tool for semi-automated evaluation of yeast colony images. *Communications in Computer and Information Science* 273: 110–125.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W. (2012): NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9: 671–675.
- Schroder, M., Chang, J.S., Kaufman, R.J. (2000): The unfolded protein response represses nitrogen-starvation induced developmental differentiation in yeast. *Genes Development* 14: 2962–2975.

- Schuck, S., Prinz, W.A., Thorn, K.S., Voss, C., Walter, P. (2009): Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response. *The Journal of Cell Biology* 187: 525-536.
- Singh, B.N., Hampsey, M. (2007): A transcription-independent role for TFIIB in gene looping. *Molecular Cell* 27: 806–816.
- Spallholz, J.E. (1997): Free radical generation by selenium compounds and its prooxidant toxicity. *Biomedical and Environmental Sciences* 10: 260–270.
- Spear, E., Ng, D.T. (2001): The unfolded protein response: no longer just a special teams player. *Traffic* 2: 515-523.
- Spingola, M., Grate, L., Haussler, D., Ares, M., Jr. (1999): Genome-wide bioinformatic and molecular analysis of introns in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 5: 221–234.
- Stratford, M., Rose, A.H. (1986): Transport of sulphur dioxide by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of general microbiology* 132: 1-6.
- Sudbery, P., Gow, N., Berman, J. (2004): The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology* 12: 317–324.
- Sundström, P. (2006): *Candida albicans* hypha formation and virulence. In: Heitman, J., Filler, S.G., Edwards, J.E., Mitchell, A.P. (Eds.), *Molecular Principles of Fungal Pathogenesis*. ASM Press, Washington, DC 45–47.
- Šťovíček, V., Váchová, L., Kuthan, M., Pálková, Z. (2010): General factors important for the formation of structured biofilm-like yeast colonies. *Fungal Genetics and Biology* 47: 1012-1022.
- Tae-Hee, L., Yi-Hyun, B., Myoung-Dong, Kimb., Jin-Ho, S. (2012): Overexpression of *HAC1* gene increased levels of both intracellular and secreted human kringle fragment in *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry* 47: 2300-2305.
- Timpel, C., Strahl-Bolsinger, S., Ziegelbauer, K., Ernst, J.F. (1998): Multiple functions of Pmt1p-mediated protein O-mannosylation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 20837-20846.
- Timpel, C., Zink, S., Strahl-Bolsinger, S., Schroppel, K., Ernst, J. (2000): Morphogenesis, adhesive properties, and antifungal resistance depend on the Pmt6 protein mannosyltransferase in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology* 182: 3063-3071.
- Tirasophon, W., Welihinda, A.A., Kaufman, R.J. (1998): A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes & Development* 12: 1812–1824.
- Toone, W.M., Jones, N. (1998): Stress-activated signaling pathways in yeast. *Genes Cells* 3: 485–498.
- Travers, K.J., Patil, C.K., Wodicka, L., Lockhart, D.J., Weissman, J.S., Walter, P. (2000): Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* 101: 249–258.
- Tsvetanova, T.G., Riordan, D.P., Brown, P.O. (2012): The yeast Rab GTPase Ypt1 modulates unfolded protein response dynamics by regulating the stability of *HAC1* RNA. *PLoS Genetics* 8: e1002862.
- Ullrich, T.C., Huber, R. (2001): The complex structures of ATP sulfurylase with thiosulfate, ADP and chlorate reveal new insights in inhibitory effects and the catalytic cycle. *Journal of Molecular Biology* 313: 1117-1125
- Upton, A., Kirby, K.A., Carpenter, P., Boeckh, M., Marr, K.A. (2007): Invasive aspergillosis following hematopoietic cell transplantation: outcomes and prognostic factors associated with mortality. *Clinical Infectious Diseases* 44:531–540.
- Váchová, L., Šťovíček, V., Hlaváček, O., Chernyavskiy, A., Štěpánek, L., Kubínová, L., Pálková, Z. (2011): Flo11p, drug efflux pumps, and the extracellular matrix cooperate to form biofilm yeast colonies. *The Journal of Cell Biology* 194: 679-87.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006): Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160: 1-40.

- Valkonen, M., Penttilä, M., Saloheimo, M. (2002): Effects of inactivation and constitutive expression of the unfolded-protein response pathway on protein production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2065-2072.
- Vembar, S.S., Brodsky, J.L. (2008): One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9: 944–957.
- Voordeckers, K., De Maeyer, D., van der Zande, E., Vincens, M.D., Meert, Cloots, L., Oven, R., W., Marchal, K., Verstrepen, K.J. (2012): Identification of a complex genetic network underlying *Saccharomyces cerevisiae* colony morphology. *Molecular Microbiology* 86: 225–239.
- Vopálenská, I., Štoviček, V., Janderová, B., Váchová, L., Pálková, Z. (2010): Role of distinct dimorphic transitions in territory colonizing and formation of yeast colony architecture. *Environmental Microbiology* 12: 264-277.
- Warbrick, E., Fantes, P.A. (1991): The *wis1* protein is a dosage-dependent regulator of mitosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *The EMBO Journal* 10:4291–4299.
- Welihinda, A.A., Tirasophon, W., Green, S.R., Kaufman, R. J. (1997): Gene induction in response to unfolded protein in the endoplasmic reticulum is mediated through Ire1p kinase interaction with a transcriptional coactivator complex containing Ada5p. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A* 94: 4289–4294.
- Welihinda, A.A., Tirasophon, W., Kaufman, R.J. (2000): The transcriptional co-activator *ADA5* is required for *HAC1* mRNA processing in vivo. *The Journal of biological chemistry* 275: 3377–3381.
- Williams, D.B. (2006): Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science* 119: 615–623.
- Wimalasena, T.T., Enjalbert, B., Guillemette, T., Plumridge, A., Budge, S., Yin, Z., Brown, A.J.P., Archer, D.B. (2008): Impact of the unfolded protein response upon genome-wide expression patterns, and the role of Hac1 in the polarized growth, of *Candida albicans*. *Fungal Genetics and Biology* 45: 1235–1247.
- Yarbrough, H.F., Jr., Clark, F.M. (1957): Utilization of inositol, an essential metabolite for *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Bacteriology* 73: 318–323.
- Yorimitsu, T., Nair, U., Yang, Z., Klionsky, D.J. (2006): Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 30299–30304.
- Zhou, J., Liu, C.Y., Back, S.H., Clark, R.L., Peisach, D., Xu, Z., Kaufman, R.J. (2006): The crystal structure of human *IRE1* luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:14343-14348.